

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Daniel Teixeira de Oliveira

**O PAPEL HIPERNOCICEPTIVO DA SEROTONINA  
ARTICULAR**

Florianópolis

2010



Daniel Teixeira de Oliveira

**O PAPEL HIPERNOCICEPTIVO DA SEROTONINA  
ARTICULAR**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Farmacologia do Centro de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal  
de Santa Catarina, como requisito à  
obtenção do Título de Mestre em  
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério  
Tonussi.

Florianópolis

2010



Dedico esta dissertação aos meus pais, José Carlos e Elizabeth, o maior exemplo de amor e união que já conheci; e à minha esposa, Estela, pelo incentivo carinhoso que me faz acreditar tudo ser possível.



## **AGRADECIMENTOS**

A Carlos Rogério Tonussi, meu amigo e orientador além dos limites do laboratório, pela oportunidade de realizar esta especialização convivendo num ambiente tão engrandecedor;

A meu grande amigo e companheiro de bancada Eduardo Souza Silva pela participação braçal e intelectual nesta dissertação;

Aos animais utilizados.





*O dono da dor sabe o  
quanto dói*

Zeca Pagodinho



## RESUMO

Muitas linhas de pesquisa sugerem que a serotonina tem importantes papéis nos tecidos periféricos durante as afecções articulares. Nosso objetivo neste estudo foi o de investigar a participação da serotonina na incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático após a injeção de formalina 2% no joelho de ratos. Incapacitação articular foi medida através do tempo de elevação da pata (TEP; s) durante o período de 1 minuto de caminhada forçada, a cada 5 minutos, durante uma sessão experimental de 60 minutos. Edema articular foi avaliado pelo aumento de diâmetro articular, (DA; mm), e o extravasamento de plasma foi medido pela quantidade de azul de evans (25 mg / kg, i.v., 30 min antes do teste) no líquido sinovial (EP; mg / ml) 1 hora após a injeção de formalina. Formalina evocou duas fases de incapacitação, bem como aumento do DA e EP de forma dose-dependente. Serotonina sozinha (1; 10 e 100 nmol, i.a.) não modificou a nocicepção, entretanto todas as doses aumentaram o DA, e somente a maior dose causou aumento do EP. Serotonina (100 nmol, i.a.) co-injetada com formalina causou hipernocicepção em ambas as fases. Nenhuma dose alterou o DA ou EP. NAN-190 (100, 200 e 600 fmol, i.a.), ciproheptadina (160, 500, 1.500 fmol, i.a.) e ondansetrona (65 e 260 fmol, i.a.) diminuíram a nocicepção na 2ª fase. Nenhuma dose alterou o DA. Ciproheptadina (1.500 fmol, i.a.) aumentou o EP. Sumatriptano (1.5 e 5 pmol, i.a.) causou hipernocicepção na 2ª fase sem alterar o DA ou EP. Cromoglicato (1.6 mg, i.a.) não inibiu a hipernocicepção do sumatriptano nem alterou o DA e EP, assim como os pré-tratamentos com indometacina (2.5 mg/kg, i.p.) e furosemida (20 mg/kg, i.p.). Nossos resultados sugerem que a serotonina causa hipernocicepção ao menos via receptores 5-HT1-3 sem efeitos vasculares associados e que a hipernocicepção periférica do sumatriptano possivelmente é devido a mecanismo celular diferente do atribuído.

**Palavras-chave:** Serotonina, periferia e hipernocicepção.



## ABSTRACT

Several lines of evidence suggest that serotonin plays important roles in peripheral tissues during articular affections. Our aim in this study was to investigate the participation of serotonin in the articular incapacitation, edema and plasma leakage after formalin (2%) injection in rat knee joints. Articular incapacitation was measured by paw elevation time (PET; s) during 1 minute of forced walk, each 5 minutes, during an experimental session of 60 minutes. Knee swelling was assessed by an increase in articular diameter (AD; mm), and plasma leakage was measured by the amount of Evans blue (25 mg / kg, i.v., 30 min before the test) in the synovial fluid (PL; mg / ml) 1 hour after injection of formalin. Formalin evoked two phases of disability, and increased AD and PL in a dose-dependent manner. Serotonin alone (1, 10 and 100 nmol, i.a.) did not cause nociception, however all doses increased the AD, and only the highest dose caused an increase in PL. Serotonin (100 nmol, i.a.) co-injected with formalin caused hypernociception in both phases. Neither dose altered the AD or PL. NAN-190 (100, 200 and 600 fmol, i.a.), cyproheptadine (160, 500 and 1.500 fmol, i.a.) and ondansetron (65 and 260 fmol, i.a.) decreased nociception. Neither doses altered the AD. Cyproheptadine (1500 fmol, i.a.) increased the PL. Sumatriptan (1.5 and 5 pmol, i.a.) caused hypernociception. Cromoglycate (1.6 mg, i.a.) did not reduce sumatriptan hypernociception, neither the pre-treatment with indometacin (2.5 mg/kg, i.p.) or furosemide (20 mg/kg, i.p.). Our results suggest that the hypernociceptive effect of serotonin occurs at least by 5-HT<sub>1-3</sub> receptors, without participation of vascular effects and the peripheral hypernociception of sumatriptan is possibly due to a different cellular mechanism not yet explored.

**Keywords:** Serotonin, periphery, hypernociception.



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Características das fibras nervosas aferentes  
periféricas

3





## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Dose-resposta da formalina no modelo de incapacitação articular	16
Gráfico 2 - Efeito dose-resposta da formalina no diâmetro articular e extravasamento plasmático	17
Gráfico 3 - Efeito da 5-HT no teste de incapacitação articular	19
Gráfico 4 - Efeito da 5-HT na variação de edema e extravasamento plasmático	20
Gráfico 5 - Efeito da 5-HT combinada à formalina no teste de incapacitação articular	22
Gráfico 6 - Efeito da 5-HT combinada à formalina na variação de edema e extravasamento plasmático	23
Gráfico 7 - Efeito do NAN-190 combinado à formalina no teste de incapacitação articular	25
Gráfico 8 - Efeito do NAN-190 combinado à formalina na variação de edema e extravasamento plasmático	26
Gráfico 9 - Efeito da ciproheptadina combinada à formalina no teste de incapacitação articular	28
Gráfico 10 - Efeito da ciproheptadina combinada à formalina na variação de edema e extravasamento plasmático	29
Gráfico 11 - Efeito da ondansetrona combinada à formalina no teste de incapacitação articular	31

Gráfico 12 - Efeito da ondansetrona combinada à formalina na variação de edema e extravasamento plasmático	32
Gráfico 13 - Efeito do sumatriptano combinado à formalina no teste de incapacitação articular	34
Gráfico 14 - Efeito do sumatriptano combinado à formalina na variação de edema e extravasamento articular	35
Gráfico 15 - Efeito do cromoglicato de sódio na combinação sumatriptano/formalina na incapacitação articular	37
Gráfico 16 - Efeito do cromoglicato de sódio na combinação sumatriptano/formalina sobre a variação de edema e extravasamento plasmático	38
Gráfico 17 - Efeito da indometacina na combinação sumatriptano/formalina no teste de incapacitação articular	40
Gráfico 18 - Efeito da indometacina na combinação sumatriptano/formalina sobre a variação de edema e extravasamento plasmático	41
Gráfico 19 - Efeito da furosemida no teste de incapacitação articular induzido por formalina	43
Gráfico 20 - Efeito da furosemida na variação de edema e extravasamento plasmático induzidos por formalina 2%	44
Gráfico 21 - Efeito da furosemida na combinação sumatriptano/formalina no teste de incapacitação articular	46
Gráfico 22 - Efeito da furosemida na combinação sumatriptano/formalina sobre a variação de edema e extravasamento plasmático	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina  
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico  
ATP – Trifosfato de adenosina  
CPT – Ciproheptadina  
Cromo – Cromoglicato de sódio  
DA – Diâmetro articular  
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético  
EP – Extravasamento plasmático  
F1 – Primeira fase do teste de formalina  
F2 – Segunda fase do teste de formalina  
GABA – Ácido gama-aminobutírico  
OMS – Organização mundial de saúde  
IASP – International association for the study of pain  
For – Formalina  
Indo – Indometacina  
NAN – NAN-190  
NKCC – Co-transportadores de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$   
OND – Ondansetrona  
PGE2 – Prostaglandina E2  
PLC – Fosfolipase C  
SMT – Sumatriptano  
TEP – Tempo de elevação da pata  
Veic – Veículo



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 AFECÇÕES ARTICULARES	1
1.2 FISIOLÓGIA DOS SINTOMAS ARTICULARES	1
1.3 SEROTONINA	4
1.4 ESTUDO DA DOR E INFLAMAÇÃO ARTICULARES	6
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>9</b>
3.1 ANIMAIS	9
3.2 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	9
3.3 MODELO EXPERIMENTAL	10
<b>3.3.1 Teste de Incapacitação Articular</b>	<b>10</b>
<b>3.3.2 Indução de Incapacitação Articular por Formalina</b>	<b>11</b>
<b>3.3.3 Avaliação da Incapacitação Articular</b>	<b>11</b>
<b>3.3.4 Avaliação do Edema Articular</b>	<b>11</b>
<b>3.3.5 Avaliação do Extravasamento Plasmático</b>	<b>12</b>
3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	13
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	14

<b>4 RESULTADOS</b>	<b>15</b>
4.1 EFEITO DA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE FORMALINA NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO	15
4.2 EFEITO DA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE 5-HT NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO	18
4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE 5-HT COMBINADA À FORMALINA NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO	21
4.4 PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT1 NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDOS PELA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE FORMALINA	24
4.5 PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT2 NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDOS PELA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE FORMALINA	27
4.6 PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT3 NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDOS PELA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE FORMALINA	30
4.7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE SUMATRIPTANO COMBINADO À FORMALINA NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO	33
4.8 INFLUÊNCIA DOS MASTÓCITOS NA HIPERNOCICEPÇÃO GERADA PELA COMBINAÇÃO SUMATRIPTANO/FORMALINA	36

4.9 INFLUÊNCIA DE PROSTAGLANDINAS NA HIPERNOCICEPÇÃO GERADA PELA COMBINAÇÃO SUMATRIPTANO/FORMALINA	39
4.10 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE FUROSEMIDA COMBINADA À FORMALINA NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO	42
4.11 INFLUÊNCIA DOS CO-TRANSPORTADORES $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ NA HIPERNOCICEPÇÃO GERADA PELA COMBINAÇÃO SUMATRIPTANO/FORMALINA	45
<b>5 DISCUSSÃO</b>	48
<b>6 CONCLUSÕES</b>	57
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	58
<b>ANEXO – DESCRIÇÃO RESUMIDA DA PUNÇÃO GENGIVAL</b>	73

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 AFECÇÕES ARTICULARES

As desordens músculo-esqueléticas são a causa mais freqüente de incapacitação funcional no mundo moderno (OMS, 2003; IASP, 2009) e a prevalência destas enfermidades está subindo a níveis alarmantes.

O motivo pelo qual o surgimento de novos casos tem aumentado pode ser resumido através da resultante de dois aspectos: o primeiro, fisiológico, trata-se do desgaste tecidual decorrente do passar dos anos. Esse desgaste, inexorável, está diretamente associado à progressiva perda de função, tendo como desfecho final a incapacitação definitiva. O segundo, epidemiológico e mais animador, é a constante projeção do envelhecimento populacional.

Dentre as diversas desordens músculo-esqueléticas, as afecções articulares compõem enorme parcela. Estima-se que a osteoartrite, uma doença articular degenerativa, afetará ao menos uma articulação de parcela superior a 90 % das pessoas acima de sessenta e cinco anos, que terão ainda mais articulações acometidas com o passar do tempo (IASP, 2009). Tal previsão torna-se ainda mais desconfortável se levarmos em consideração que o sintoma mais prevalente destas afecções é a dor, sendo normalmente acompanhado de ao menos outro clássico sinal inflamatório como edema, calor, rubor e impotência funcional (TEIXEIRA et al., 2006).

## 1.2 FISILOGIA DOS SINTOMAS ARTICULARES

Apesar de afetar milhões de pessoas pelo mundo, o motivo pelo qual nossas articulações doem permanece sendo um enigma não totalmente desvendado. Desta maneira, são comuns os relatos de pacientes insatisfeitos com os tratamentos disponíveis ora pela falta de efetividade, ora pelos significantes efeitos adversos.

Neste contexto, os resultados de diversas pesquisas sobre os mecanismos responsáveis pela dor articular demonstram aspectos importantes de sua fisiologia.



Dentre as fibras nervosas aferentes periféricas componentes do sistema nervoso (tabela 1), cerca de 80 % das relacionadas ao joelho de ratos e gatos são nociceptivas (LANGFORD, 1983; LANGFORD e SCHMIDT, 1983; HILDEBRAND et al., 1991). Sendo assim, imagina-se que as articulações possuam elaboração sensitiva muito adequada para perceber movimentos anormais e potencialmente lesivos.

Nas afecções articulares, a dor, que normalmente ocorre aos exercícios ou até mesmo durante as atividades de vida diária, é atribuída inicialmente à sensibilização periférica, seguida de sensibilização central (SCHAIBLE, 2009). No caso, “sensibilização” é um termo utilizado para descrever alterações funcionais de neurônios nociceptivos. Tais alterações podem ser explicadas como: 1) respostas exacerbadas do neurônio à estímulos que estariam dentro da faixa normal de seu limiar de ativação; 2) ativação do neurônio desencadeada por estímulo que normalmente não a causaria. Clinicamente estas situações são reconhecidas como hiperalgesia e alodinia, respectivamente (LOESER e TREED, 2008).

Na sensibilização periférica da articulação as fibras Aδ de baixo limiar passam a responder de maneira potencializada à estímulos mecânicos inócuos e nociceptivos. Já as fibras Aδ e C de alto limiar passam a responder aos estímulos mecânicos menos intensos e também de maneira exacerbada aos nociceptivos (McDOUGALL, 2006).

Acredita-se que a sensibilização de fibras aferentes primárias para estímulos mecânicos é gerada pela ação de mediadores inflamatórios nos terminais livres dos neurônios nociceptivos (FLAKE e GOLD, 2005). Tal situação torna-se possível já que no tecido periférico muitas substâncias neuroativas são liberadas de células específicas em resposta a lesões (SCHAIBLE, 2006).

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos identificam os mastócitos como células extremamente influentes no processo de degeneração articular. Sua atuação ocorre desde os momentos iniciais da lesão tecidual, onde inúmeros mediadores são liberados de seus grânulos em questão de segundos, incluindo histamina, bradicinina, proteoglicanos, proteases neutras (HORIGOME et al., 1993, DRAY et al., 1994; NIGROVIC,

Tabela 1 – Características das fibras nervosas aferentes periféricas.

<b>Tipo de fibra</b>	<b>Mielina</b>	<b>Velocidade de condução (m/s)</b>	<b>Tipo de terminação</b>	<b>Localização do receptor</b>	<b>Sensação</b>
Ia	Sim	70 - 120	Fuso neuro-muscular	Músculo	Propriocepção
Ib	Sim	70 - 120	Órgão tendinoso de Golgi	Tendão	Alongamento ou contração muscular
A $\beta$	Sim	25 - 70	Corpúsculo de Meissner, células de Merkel, corpúsculo de Pacini, terminação de Ruffini, folículo piloso, fuso neuro-muscular	Pele, músculo e articulação	Toque, pressão, vibração, senso de posição e alongamento muscular
<b>A<math>\delta</math></b>	<b>Pouca</b>	<b>2 - 25</b>	<b>Livre</b>	<b>Pele, músculo, articulação, tendão, osso, periósteo e fáscia</b>	<b>Percepção de estímulo nocivo</b>
<b>C</b>	<b>não</b>	<b>&lt; 2</b>	<b>Livre</b>	<b>Pele, músculo, articulação, tendão, osso, periósteo e fáscia</b>	<b>Percepção de estímulo nocivo</b>

Em negrito, as fibras que compõem 80% da inervação nociceptiva articular. Adaptado de Sluka (2009).

2004) e serotonina (KUSHNIR-SUKHOV et al., 2007; RINGVALL et al., 2008). Em uma fase intermediária após a estimulação, os mastócitos iniciam a síntese de eicosanóides oriundos da clivagem de ácido araquidônico de fosfolipídios de membrana. Dentro de horas, em uma fase posterior à estimulação, estas células promovem a transcrição e tradução de novos genes gerando uma série de citocinas e quimiocinas (GILFILLAN e TKACZYK, 2006).

Além de serem capazes de sensibilizar os nociceptores, muitos destes mediadores originam alterações vasculares secundárias importantes. Este processo é evidenciado pelo aumento da circulação sanguínea nos vasos articulares e subsequente aumento da permeabilidade vascular, migração de células e extravasamento de proteínas do plasma através das fenestrações nos capilares subsinoviais para o interior da articulação. Em consequência ocorre a modificação local dos mecanismos de Frank-Starling, onde a pressão oncótica intra-articular fica maior do que nos vasos sanguíneos adjacentes promovendo exsudação de plasma para dentro do espaço articular (PIETRUCK et al., 2003). Este fenômeno, aliado ao aumento da pressão hidrostática secundária à vasodilatação, leva à fuga de líquido e seu acúmulo no tecido intersticial, contribuindo também para a formação do edema.

Dentre os diversos mediadores potencialmente envolvidos, a serotonina (5-HT), por ser classificada como uma das principais aminas neuro e vasoativas inflamatórias, é considerada responsável de generosa parcela dos mecanismos relacionados à sintomatologia das afecções articulares.

### 1.3 SEROTONINA

Sintetizada a partir do aminoácido triptofano, a 5-HT foi originalmente descrita tendo sua capacidade de regular o tônus de vasos sanguíneos (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Distribuída largamente pelo organismo, esta molécula tem importantes papéis no estresse, apetite, sono, desejo sexual, memória, comportamento e dor (AZIMITIA, 2007).

Sabe-se que a 5-HT liberada de estruturas centrais superiores como o tronco encefálico é capaz de causar analgesia em nível medular, sendo este mecanismo considerado parte

integrante do sistema inibitório descendente (YAKSH et al., 1979). Além disto, a 5-HT medular é capaz de modular processos de inflamação periférica pelo controle do nível de atividade dos terminais centrais de nociceptores. Esta atividade é tida como fator causa na geração do reflexo da raiz dorsal, responsável pela liberação de neuropeptídeos componentes da inflamação neurogênica (DAHER et al., 2004).

Nos tecidos periféricos a 5-HT pode gerar dor quando aplicada em humanos (ERNBERG et al., 2000; RUAÑO et al., 2007) e nocicepção (OLIVEIRA et al., 2005) e hiperalgesia em roedores (TING et al., 2007). Além de ser capaz de induzir tanto excitação quanto sensibilização de aferentes nociceptivos, a 5-HT ainda é responsável por alterações vasculares durante situações nocifensivas como lesão neuronal, tecidual ou inflamação (DOAK e SAWYNOK, 1997). Tais situações ocorrem tanto de maneira direta, através da ligação 5-HT/receptor neuronal, quanto indireta, por meio de interação com células encontradas no local de lesão e a conseqüente liberação de outras substâncias algogênicas pró-inflamatórias (SOMMER, 2004).

Os níveis de serotonina presentes no líquido sinovial de articulações artríticas parecem estar diretamente ligados à dor (SCHAIBLE e GRUBB, 1993; TING et al., 2007; RODRIGUES et al, 2006; YANGUO et al, 2006) e à indução de edema e extravasamento plasmático (YANGUO et al., 2006; XIE et al, 2003). Assim como em outros tecidos, acredita-se que sua principal fonte de liberação na articulação ocorra principalmente a partir de mastócitos e plaquetas (ANDEN et al., 1967; LEHTOSALO et al., 1984; ALSTEGREN et al., 1997).

Para causar seus efeitos, a 5-HT necessita estar em níveis normais ou aumentados na presença de seus receptores. Sete principais grupos de receptores, juntamente de seus subtipos já foram identificados (HOYER et al., 2002), possuindo cada um, localização específica nos tecidos e respostas variadas quando acionados.

Levando-se em consideração que o RNA-m dos receptores 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT2A, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT4 e 5-HT7 foram encontrados no gânglio da raiz dorsal (PIERCE et al., 1995, 1996; NICHOLSON et al., 2003;), faz sentido esperar que estes estarão presentes em nervos sensoriais periféricos responsáveis pela inervação do joelho. Já os

receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> foram identificados em algumas células participantes do processo inflamatório como macrófagos, células NK, células dendríticas, eosinófilos e linfócitos B (BETTEN et al., 2001; FREIRE-GARABAL et al., 2003; IDZKO et al., 2004; BOEHME et al., 2004; BONDESSON et al., 1996; IKEN et al., 1995), sendo também possíveis alvos de ativação serotoninérgica no processo de lesão.

Embora estudos clínicos (ERNBERG et al., 1999; KOPP, 1998) e laboratoriais (OLIVEIRA et al., 2005; SEIDE et al., 2004; DOAK e SAWYNOK, 1997) demonstrem que o uso de antagonistas dos receptores supracitados seja capaz de atenuar a dor e inflamação, permanece inconclusivo o mecanismo de ação nociceptivo e pró-inflamatório da 5-HT nos processos de dor articular, já que a análise destes parâmetros em conjunto não foi estudada.

#### 1.4 ESTUDO DA DOR E INFLAMAÇÃO ARTICULARES

A participação dos mediadores inflamatórios nas articulações tem sido investigada por meio de diversos modelos experimentais, tais como os induzidos por cristais de urato de sódio (KOHN et al., 1962; CODERRE e WALL, 1987), adjuvante de Freund (PIRCIO et al., 1975), carragenina (VAN ARMAN et al., 1970), antígenos (BRACKERTZ, 1977), iodo-acetato monossódico (FERNIHOUGH et al., 2004 ;SCHUELERT e MCDOUGALL, 2009) e formalina (MARTINS et al., 2006).

O teste da formalina originalmente é caracterizado a partir da administração do agente irritante no tecido subcutâneo constituindo um modelo bifásico de dor persistente, no qual a duração do comportamento nociceptivo é de aproximadamente uma hora (DEBUISSON e DENNIS, 1977; ABBOTT et al., 1995).

A primeira fase da resposta nocifensiva da formalina (dor aguda), está relacionada à ativação direta dos nociceptores, devido à estimulação química periférica (WHEELER-ACETO e COWAN, 1991; TAYLOR et al., 2000). Na segunda fase (dor tônica) o comportamento nociceptivo é gerado pela estimulação contínua dos nociceptores por mediadores secundários inflamatórios e/ou pela hiperexcitabilidade da medula espinhal induzida pela primeira fase (sensibilização central) (DICKENSON

e SULLIVAN, 1987; CODERRE et al., 1990; TJØLSEN et al., 1992; TAYLOR et al., 1995). O intervalo entre a primeira e a segunda fase é denominado período de quiescência sendo resultante da inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supra-espinhais e espinhais (KANEKO e HAMMOND, 1997) em resposta ao estímulo da primeira fase.

Este teste experimental é amplamente utilizado para avaliar o efeito de fármacos analgésicos, sendo considerado um modelo de dor inflamatória tônica (CARSTENS, 1997; TJØLSEN et al., 1992). Sabe-se que a dor elicitada pela formalina é apenas um dos componentes de uma reação inflamatória local onde as aminas oriundas de mastócitos influenciam diretamente (PARADA et al., 2001; SHIBATA et al., 1989).

Além dos efeitos nociceptivos causados pela formalina, esta substância também gera edema local e extravasamento plasmático induzido direta e indiretamente por este agente (HONG e ABBOTT, 1995).

A adaptação do teste de formalina para o tecido articular foi realizado recentemente pelo nosso grupo (MARTINS et al., 2006) e mostrou que as propriedades nociceptivas e inflamatórias deste agente são mantidas de maneira similar ao teste cutâneo original. Sendo assim, e levando-se em consideração que a 5-HT também participa dos mecanismos induzidos por este teste, a presente dissertação demonstra os efeitos da participação serotoninérgica na articulação estimulada por formalina.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a participação serotoninérgica no teste de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina intra-articular.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar o papel da 5-HT na articulação sem haver outro estímulo nocifensivo associado;
- Determinar a resposta gerada pela associação de 5-HT à formalina na articulação;
- Avaliar o papel do receptor 5-HT<sub>1</sub> nos efeitos causados pela formalina intra-articular;
- Avaliar o papel do receptor 5-HT<sub>2</sub> nos efeitos causados pela formalina intra-articular;
- Avaliar o papel do receptor 5-HT<sub>3</sub> nos efeitos causados pela formalina intra-articular;
- Avaliar a ação e determinar os mecanismos da ativação dos receptores 5-HT<sub>1</sub> na articulação estimulada por formalina.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Os procedimentos experimentais foram realizados com ratas Wistar com idade de três meses e peso entre 190 e 250 gramas. Os animais foram criados e mantidos em biotério sob controle de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luz (ciclo claro/escuro de 12 horas), dispondo de livre acesso à água e ração. Foram removidos do biotério para ambientação de uma hora antes de quaisquer procedimentos experimentais, sendo os mesmos realizados normalmente no período matutino e quando necessário se estenderam para o período vespertino. Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética local para o uso de animais (CEUA/UFSC Nº 23080.057206/2008-20) e conduzidos de acordo com as diretrizes éticas da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1983).

Foi realizada a randomização dos animais nos grupos experimentais de acordo com o ciclo estral encontrado antes do início de cada teste.

#### 3.2 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

- **Azul de Evans (Vetec, BRA):** corante protéico;
- **Isoflurano (Cristália, BRA):** anestésico inalatório;
- **Formalina (Merck, ALE):** agente nocifensivo;
- **Serotonina (Sigma-Aldrich, EUA):** agonista dos receptores serotoninérgicos;
- **NAN-190 (Tocris, EUA):** antagonista do receptor 5-HT<sub>1</sub>;
- **Ciproheptadina (Tocris, EUA):** antagonista do receptor 5-HT<sub>2</sub>;
- **Ondansetrona (Galena, BRA):** antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub>;
- **Sumatriptano (Libbs, BRA):** agonista do receptor 5-HT<sub>1</sub>;
- **Cromoglicato de sódio (Galena, BRA):** estabilizador da membrana celular de mastócitos;
- **Indometacina (Merck, ALE):** anti-inflamatório não esteroidal;
- **Furosemida (Galena, BRA):** bloqueador do co-transportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ ;
- **Bicarbonato de sódio (Catarinense, BRA):** utilizado a 1.29% para dissolução de indometacina e furosemida;



- **Solução salina 0.9% (Aster, BRA):** para preparo das soluções;
- **EDTA (Nuclear, BRA):** utilizado a 5% como anticoagulante.

### 3.3 MODELO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1 Teste de Incapacitação Articular

O modelo de nocicepção que empregamos neste estudo foi a incapacitação articular induzida por formalina (MARTINS et al., 2006).

O sistema de registro da nocicepção articular (TONUSSI e FERREIRA, 1992) consiste de um aparato eletrônico que permite avaliar o estado funcional das articulações colocando-se os animais sobre um cilindro em rotação. O equipamento consiste dos seguintes elementos:

- Um cilindro (30 cm de altura e 30 cm de diâmetro) revestido por malha trançada em aço inox (2 mm), com separadores para formarem 3 trilhas sobre ele;
- Sapatilhas metálicas (confeccionadas em folha de flandres), as quais são adaptadas às patas traseiras dos animais e conectadas, por fios de aço revestidos, à porta paralela de um microcomputador PC compatível;
- Microcomputador.

Todo o conjunto pode ser visualizado nas imagens abaixo:



À esquerda, o equipamento eletrônico componente do teste de incapacitação articular. À direita, a sapatilha metálica acoplada à pata do animal.

### **3.3.2 Indução de Incapacitação Articular por Formalina**

A incapacitação articular foi induzida pela injeção intra-articular de formalina (2%; 50µl). O sítio de injeção (joelho direito) foi previamente submetido à anti-sepsia com solução de álcool iodado. Imediatamente após a injeção de formalina foi realizada a primeira medida da incapacitação articular (MARTINS et al., 2006).

### **3.3.3 Avaliação da Incapacitação Articular**

Com o cilindro em rotação (3 R.P.M), o animal colocado em sua trilha caminhou objetivando permanecer no topo. Através de software específico, a perda de função de apoio do membro afetado; ou seja, o tempo em que a sapatilha adaptada na pata posterior direita do animal deixou de fazer contato com a superfície metálica do cilindro é registrado no computador.

Acumulando-se o tempo em que esta pata não tocou o cilindro durante o tempo de observação de sessenta segundos, obtivemos o tempo de elevação da pata, ou TEP.

Neste modelo, o TEP de animais sem estimulação articular varia em torno de dez segundos, enquanto a injeção intra-articular de substâncias algogênicas causa elevação deste valor indicando o desenvolvimento de incapacitação articular; oriunda da nocicepção. Em todos os procedimentos experimentais os animais foram treinados a caminhar no aparelho de registro no dia anterior ao teste, quando seus valores basais foram registrados.

Durante os experimentos, a medida do TEP foi realizada a cada cinco minutos e por um período máximo de sessenta minutos. Os dados, apresentados como a média entre os valores do TEP de pelo menos seis animais, são obtidos a cada hora após a injeção de formalina (tempo de elevação da pata, s).

### **3.3.4 Avaliação do Edema Articular**

A avaliação do edema articular induzido pela formalina foi realizada através da variação do diâmetro articular, de forma que dois valores foram mensurados e comparados: um imediatamente antes da injeção de formalina e outro sessenta minutos após.

Para isso, os animais foram gentilmente imobilizados dentro de um cone de polietileno de maneira que fosse possível ter acesso apenas ao joelho direito, do qual foi obtida a medida do diâmetro da articulação tíbio-femural com o auxílio de um paquímetro milimetrado. Os dados foram apresentados como a diferença média entre o valor obtido imediatamente antes da injeção da formalina e o valor do diâmetro articular obtido sessenta minutos após (variação do diâmetro articular, mm).

### **3.3.5 Avaliação do Extravasamento Plasmático**

Sob leve anestesia por isoflurano, os animais receberam azul de evans (25 mg/kg; 0,1 ml / 100 g; i.v.) trinta minutos antes da injeção de formalina. Para essa injeção intravenosa, utilizamos o método da veia gengival descrito por De Oliveira em 2009 (anexo).

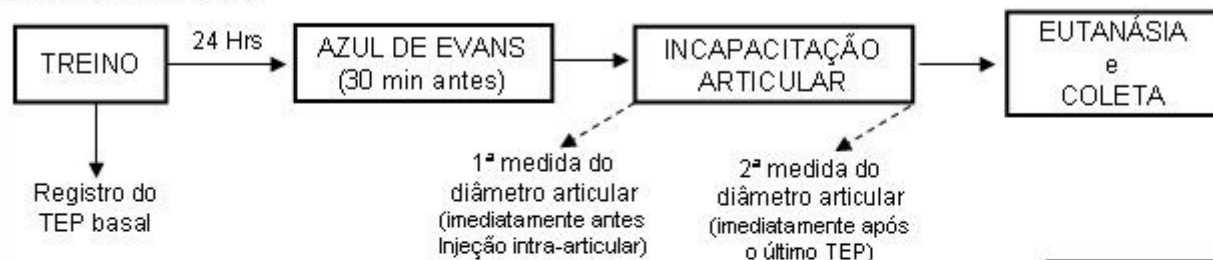
O azul de evans é um corante com alta afinidade pela albumina plasmática, sendo capaz de formar um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial lesada (STEELE e WILHELM, 1966). A partir desta ferramenta, pode-se então avaliar a intensidade de extravasamento plasmático por análise da quantidade relativa de azul de evans no tecido pesquisado, no nosso caso, a articulação.

Uma hora após a injeção de formalina, os animais foram então submetidos à eutanásia por aprofundamento de anestesia com hidrato de cloral (15%) seguido de deslocamento cervical. Em seguida, após a dissecação da articulação do joelho direito, foi realizada lavagem articular com cem microlitros de solução fisiológica somado a quatro microlitros de EDTA. A seguir foi feita a coleta deste lavado (solução e líquido sinovial) com auxílio de uma pipeta automática. O lavado foi diluído em solução fisiológica (1:50) e centrifugado (3000 R.P.M; 15 min) para acelerar o processo de hemossedimentação. O sobrenadante foi utilizado para leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (630 nm). Os valores da densidade óptica foram expressos como a média dos valores obtidos de pelo menos seis animais (extravasamento plasmático, µg/ml).

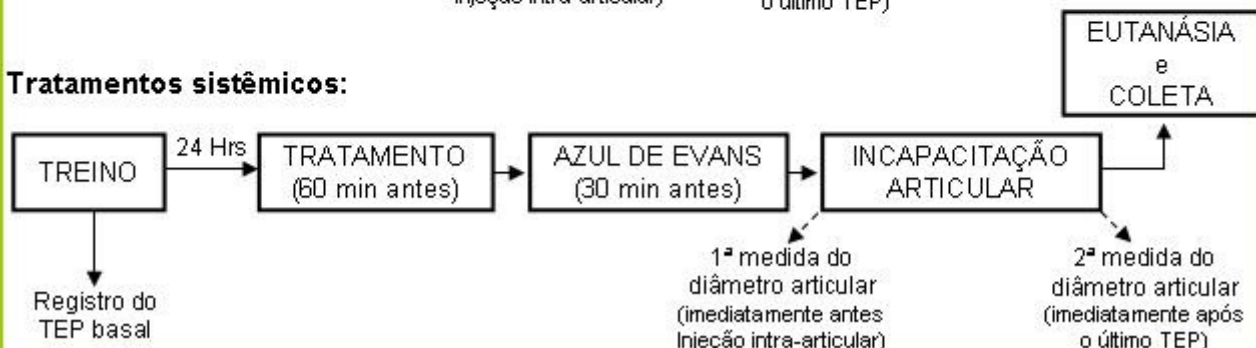
### 3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O esquema abaixo ilustra o protocolo experimental para tratamentos locais e sistêmicos:

#### Tratamentos locais:



#### Tratamentos sistêmicos:





### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados contidos nesta dissertação foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism ® versão 5 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

Todos os resultados foram expressos em média mais ou menos o erro padrão da média ( $\pm$  EPM) de seis ou sete animais por cada grupo.

No caso da incapacitação articular, durante a primeira fase do teste os grupos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, sendo seguido o teste *dunnet* ou *tukey* quando um nível de significância equivalente ao menos a  $P < 0,05$  foi detectado. Já em relação à segunda fase do teste, a faixa de tempo selecionada para análise foi marcada com uma linha vermelha no gráfico. Os valores contidos nesta faixa de tempo foram então submetidos à ANOVA de uma via com medidas repetidas, sendo seguido da mesma forma o teste *dunnet* ou *tukey* quando um nível de significância equivalente ao menos a  $P < 0.05$  foi detectado. Quando a comparação ocorreu entre somente dois grupos experimentais, foi utilizado o teste t não-pareado, sendo necessário ao menos  $P < 0.05$  para ser considerada significância estatística entre os grupos.

A análise estatística dos valores referentes à variação de diâmetro articular e extravasamento plasmático foi realizada através de ANOVA de uma via sendo seguido o teste *dunnet* ou *tukey* quando um nível de significância equivalente ao menos a  $P < 0.05$  foi detectado. Quando somente dois grupos foram submetidos à comparação, utilizamos o teste t não pareado, tendo resultado significativo quando  $P < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITO DA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE FORMALINA NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO.

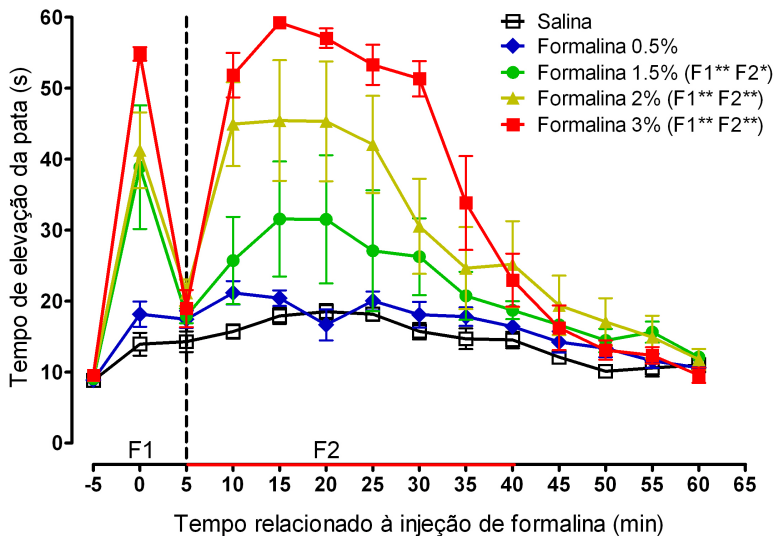
Inicialmente, com o intuito de estabelecer a concentração ideal de formalina para o seguimento dos experimentos, valores crescentes (0.5, 1.5, 2 e 3%) desse agente foram testados.

Com exceção da menor (0.5%), todas as outras concentrações foram capazes de causar hipernocicepção, aumento do diâmetro articular e extravasamento plasmático de maneira dose dependente em relação ao grupo controle (salina).

Em relação à nocicepção (gráfico 1), o aumento do TEP ocorreu em duas fases distintas, sendo a primeira logo após a injeção de formalina (F1=0-5) e a segunda, com duração mais prolongada, a partir dos 5 minutos (F2=5-60). Interpondo estas duas fases houve o período denominado quiescência onde o animal deambulou normalmente, alcançando valores basais de TEP. Ao término do teste os animais novamente deambulavam de maneira normal, sem sinais de nocicepção articular (TEP basal).

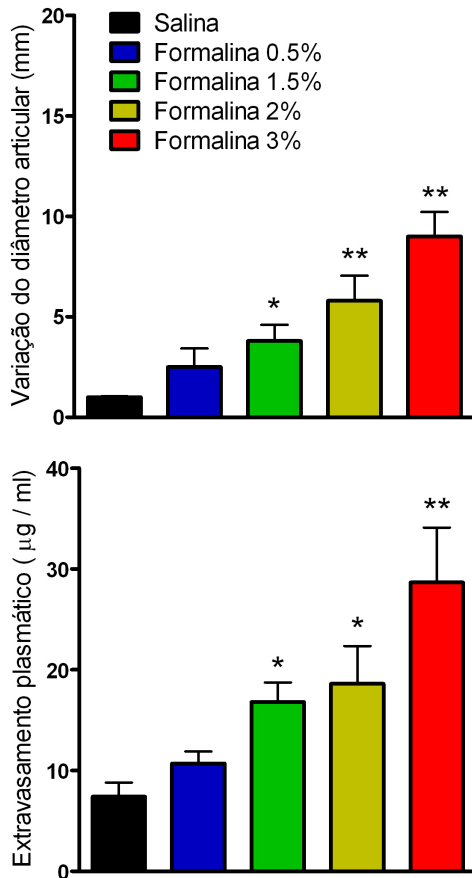
A indução de nocicepção gerada por algumas concentrações de formalina foi acompanhada de variação de edema e extravasamento plasmático (gráfico 2).

A partir desta avaliação inicial, definimos que a concentração de 2% apresenta melhor perfil para o seguimento deste estudo por ter provocado resposta mediana das variáveis analisadas.



**Gráfico 1 – Efeito da formalina no modelo de incapacitação articular.** Houve hipernocicepção induzida por formalina nas concentrações de 1.5, 2 e 3% em relação ao grupo controle (salina) em ambas as fases. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \* e \*\* representam a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente. Para análise estatística de F1 (0 min) foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *Dunnett*. Para análise de F2 (5-40 min, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnett*. A injeção intra-articular foi aplicada no tempo 0 min. O tempo -5 min indica o valor de deambulação dos animais em estado normal. Os códigos F1 e F2 simbolizam a primeira e segunda fase do teste, respectivamente.



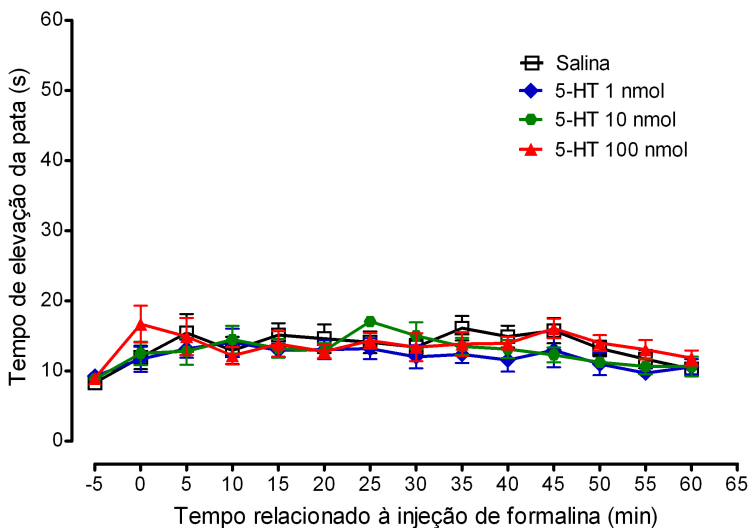


**Gráfico 2 - Efeito dose-resposta da formalina no diâmetro articular e extravasamento plasmático.** Houve aumento do diâmetro articular (acima) e extravasamento plasmático (abaixo) nas concentrações de 1.5, 2 e 3% de formalina em relação ao grupo controle (salina). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \* e \*\* representam a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0.05$  e  $P < 0.01$ , respectivamente. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

## 4.2 EFEITO DA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE 5-HT NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO.

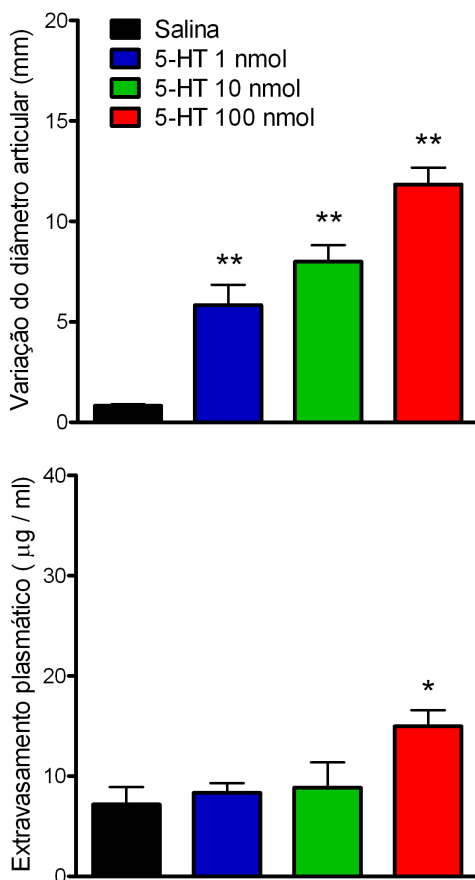
Objetivando avaliar os efeitos da ativação dos receptores serotoninérgicos no tecido articular sem que haja um estímulo nocifensivo associado, diferentes doses de 5-HT (1; 10 e 100 nmol) foram injetadas sozinhas.

Nenhuma dose utilizada foi capaz de alterar os valores de TEP em relação ao grupo controle (salina), sendo também não observado comportamento em fases distintas (gráfico 3). Contudo, todas as doses avaliadas causaram aumento significativo do diâmetro articular de maneira dose dependente, sendo somente a maior dose (100 nmol) capaz de também gerar aumento de extravasamento plasmático (gráfico 4).



**Gráfico 3 - Efeito da 5-HT no teste de incapacitação articular.**

Não houve diferença do grupo controle (salina). Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet* no intervalo de 0-60 min.

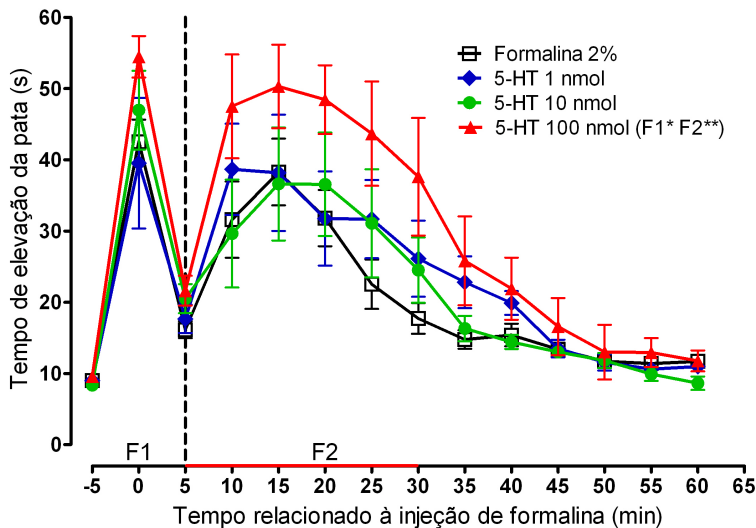


**Gráfico 4 – Efeito da 5-HT na variação de edema e extravasamento plasmático.** Todas as doses testadas promoveram aumento dose dependente do diâmetro articular (acima). Somente a maior dose aumentou o extravasamento plasmático (abaixo) em relação ao grupo controle (salina). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \* e \*\* representam a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0.05$  e  $P < 0.01$ , respectivamente. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

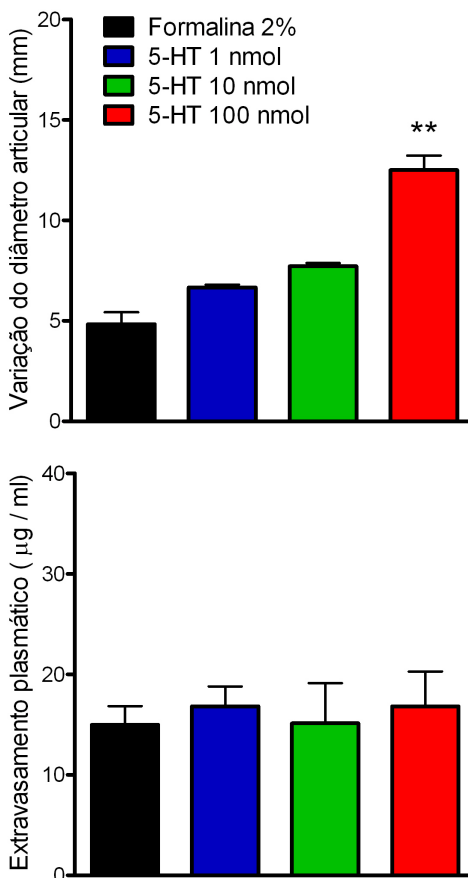
#### 4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE 5-HT COMBINADA À FORMALINA NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO.

Para avaliar a participação da 5-HT no tecido articular submetido a estímulo nocifensivo, foi realizada a combinação das mesmas doses testadas anteriormente (1, 10 e 100 nmol) à formalina 2% em uma única injeção.

Dentre as doses testadas, somente a maior (100 nmol) promoveu hipernocicepção em relação ao grupo controle (formalina 2%), sendo esta diferença presente nas duas fases (gráfico 5). Da mesma forma, somente a combinação desta dose de 5-HT com formalina foi capaz de promover aumento do diâmetro articular. Por outro lado, nenhuma dose de 5-HT foi capaz de alterar o extravasamento plasmático já causado pela formalina 2%.



**Gráfico 5 – Efeito da 5-HT combinada à formalina no teste de incapacitação articular.** A maior dose (100 nmol) aumentou a nocicepção em ambas as fases comparadas ao controle (formalina 2%). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \* e \*\* representam a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente. Para análise estatística de F1 (0 min) foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *Dunnet*. Para análise de F2 (5-30 min, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet*. A injeção intra-articular foi aplicada no tempo 0 min. O tempo -5 min indica o valor de deambulação dos animais em estado normal. Os códigos F1 e F2 simbolizam a primeira e segunda fase do teste, respectivamente.



**Gráfico 6 – Efeito da 5-HT combinada à formalina na variação de edema e extravasamento plasmático.** Somente a maior dose (100 nmol) foi capaz de promover o aumento de diâmetro articular (acima) em comparação ao grupo controle (formalina 2%). Nenhuma dose alterou o extravasamento plasmático (abaixo). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \*\* representa a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0.01$ . Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

#### 4.4 PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT<sub>1</sub> NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDOS PELA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE FORMALINA.

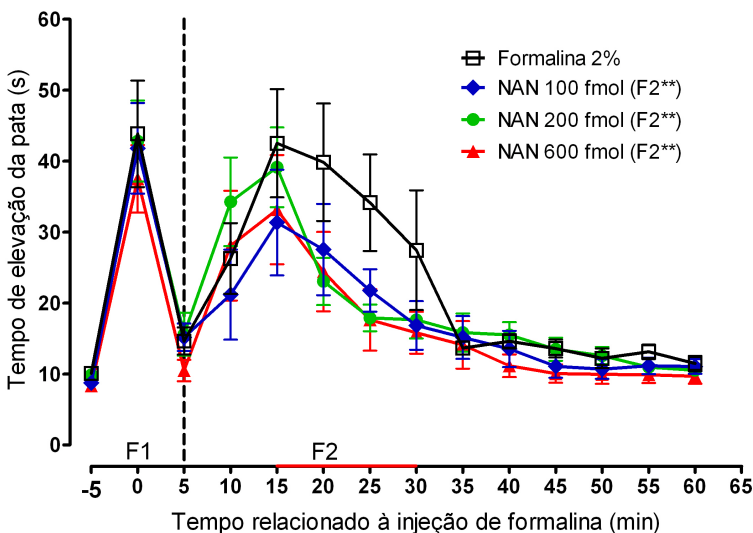
Visto a participação da 5-HT no teste de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático, passamos a discriminar a participação dos receptores serotoninérgicos possivelmente envolvidos.

Inicialmente o receptor 5-HT<sub>1</sub> foi testado por meio da utilização do antagonista NAN-190 combinado à formalina 2% em uma única injeção. A escolha das doses testadas (100, 200 e 600 fmol) baseou-se pela constante de inibição ( $K_i$ ) dos receptores 5-HT<sub>1</sub> pelo NAN-190 (WESOLOWSKA et al., 2002).

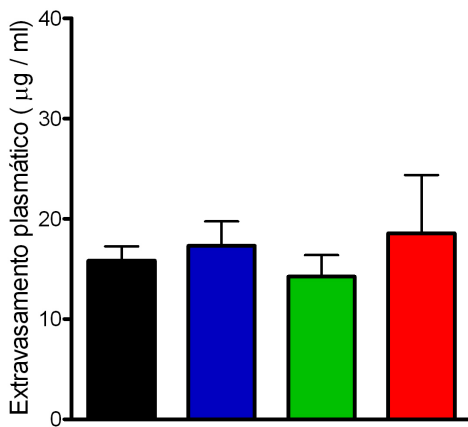
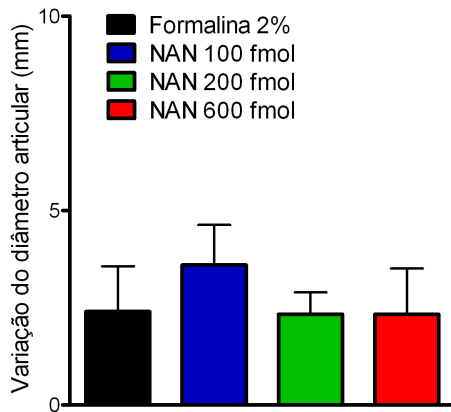
Todas as três doses testadas foram capazes de atenuar o efeito nociceptivo causado pela formalina somente na segunda fase (gráfico 7).

Não foram observadas alterações no diâmetro articular ou extravasamento plasmático (gráfico 8) em comparação ao grupo controle (formalina 2%).





**Gráfico 7 – Efeito do NAN-190 combinado à formalina no teste de incapacitação articular.** Todas as doses promoveram hiponocicepção em comparação ao grupo controle (formalina 2%) somente na segunda fase. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \*\* representa a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0,01$ . Para análise estatística de F1 (0 min) foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *Dunnet*. Para análise de F2 (15-30 min, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet*. A injeção intra-articular foi aplicada no tempo 0 min. O tempo -5 min indica o valor de deambulação dos animais em estado normal. Os códigos F1 e F2 simbolizam a primeira e segunda fase do teste, respectivamente.



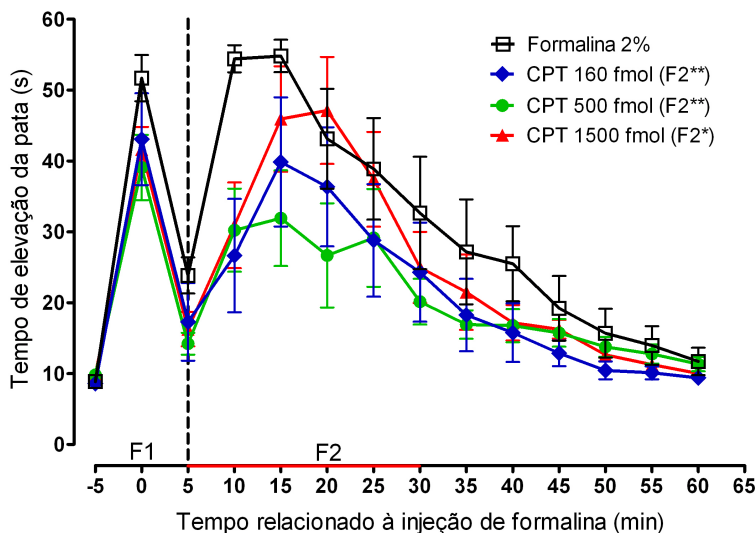
**Gráfico 8 – Efeito do NAN-190 combinado à formalina na variação de edema e extravasamento plasmático.** Nenhuma dose testada foi capaz de alterar o diâmetro articular (acima) ou o extravasamento plasmático (abaixo) em comparação ao grupo controle (formalina 2%). Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

#### 4.5 PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT<sub>2</sub> NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDOS PELA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE FORMALINA.

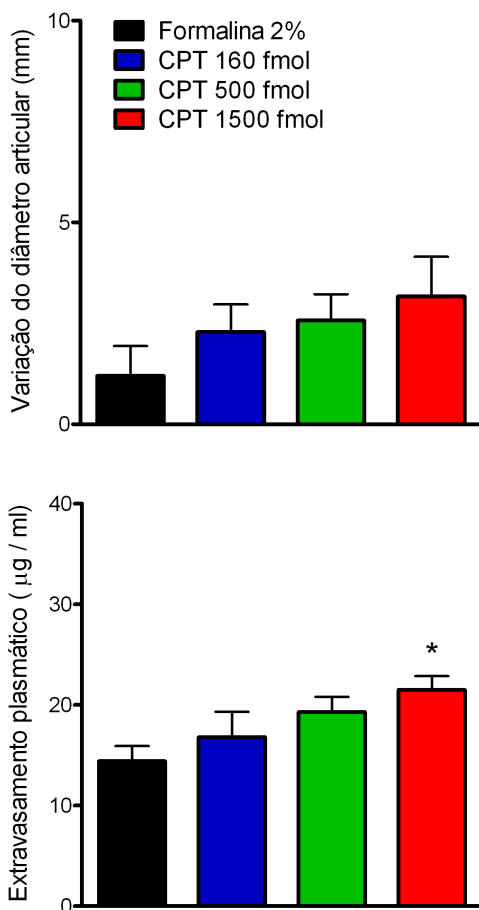
Com o objetivo de avaliar a participação do receptor 5-HT<sub>2</sub> utilizamos o antagonista ciproheptadina combinado à formalina 2% em uma única injeção. A escolha das doses testadas (160, 500 e 1500 fmol) baseou-se pela constante de inibição ( $K_i$ ) dos receptores 5-HT<sub>2</sub> pela ciproheptadina (YOUNG et al., 2005).

Todas as três doses testadas atenuaram a nocicepção causada pela formalina somente na segunda fase (gráfico 9).

Nenhuma dose foi capaz de alterar o diâmetro articular, porém a maior dose (1500 fmol) foi capaz de pronunciar o extravasamento plasmático (gráfico 10) em relação ao grupo controle (formalina 2%).



**Gráfico 9 – Efeito da ciproheptadina combinada à formalina no teste de incapacitação articular.** Todas as doses testadas causaram hiponocicepção em relação ao grupo controle (formalina 2%) somente na segunda fase. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \* e \*\* representam a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , respectivamente. Para análise estatística de F1 (0 min) foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *Dunnet*. Para análise de F2 (5-30 min, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet*. A injeção intra-articular foi aplicada no tempo 0 min. O tempo -5 min indica o valor de deambulação dos animais em estado normal. Os códigos F1 e F2 simbolizam a primeira e segunda fase do teste, respectivamente.



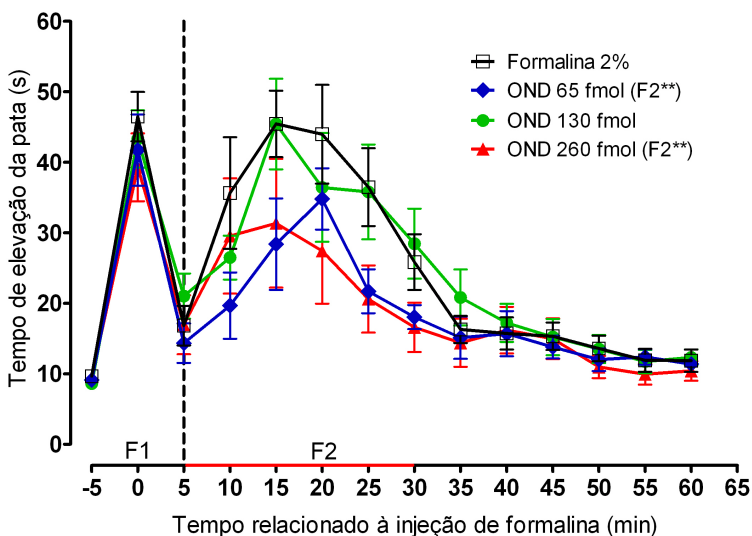
**Gráfico 10 – Efeito da ciproheptadina combinada à formalina na variação de edema e extravasamento plasmático.** Nenhuma dose modificou o diâmetro articular (acima) em comparação ao grupo controle (formalina 2%). Somente a dose 1500 fmol aumentou o extravasamento plasmático (abaixo). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \* representa a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0.05$ . Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

#### 4.6 PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT<sub>3</sub> NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDOS PELA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE FORMALINA.

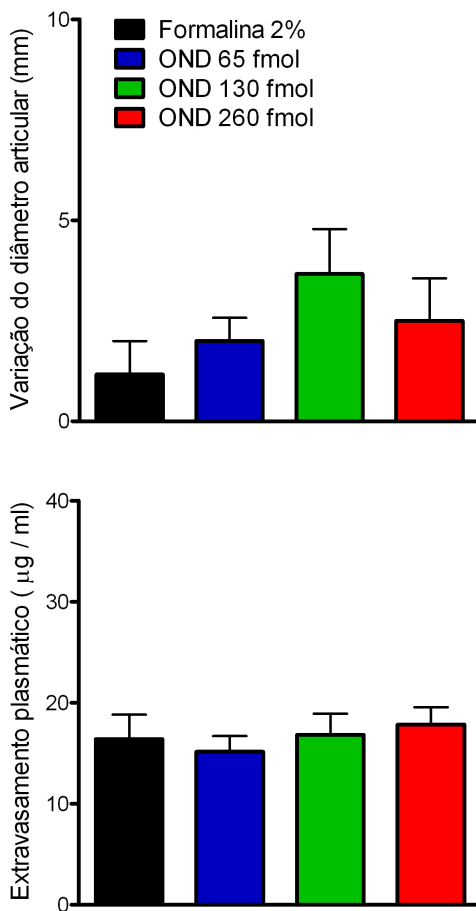
Para avaliar a participação do receptor 5-HT<sub>3</sub> utilizamos o antagonista ondansetrona combinado à formalina 2% em uma única injeção. A escolha das doses testadas (65, 130 e 260 fmol) baseou-se pela constante de inibição ( $K_i$ ) do receptor 5-HT<sub>3</sub> pela ondansetrona (KATAYAMA et al., 1997).

Somente a menor (65 fmol) e maior (260 fmol) doses foram capazes de atenuar o efeito nociceptivo causado pela formalina na segunda fase (gráfico 11).

Não foram observadas alterações no diâmetro articular ou extravasamento plasmático (gráfico 12) em comparação ao grupo controle (formalina 2%).



**Gráfico 11 – Efeito da ondansetrona combinada à formalina no teste de incapacitação articular.** As doses 65 e 260 fmol causaram hiponocicepção somente na segunda fase em comparação ao grupo controle (formalina 2%). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \*\* representa a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0,01$ . Para análise estatística de F1 (0 min) foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *Dunnett*. Para análise de F2 (5-30 min, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnett*. A injeção intra-articular foi aplicada no tempo 0 min. O tempo -5 min indica o valor de deambulação dos animais em estado normal. Os códigos F1 e F2 simbolizam a primeira e segunda fase do teste, respectivamente.



**Gráfico 12 – Efeito da ondansetrona combinada à formalina na variação de edema e extravasamento plasmático.** Nenhuma dose testada foi capaz de alterar o diâmetro articular (acima) ou o extravasamento plasmático (abaixo) em comparação ao grupo controle (formalina 2%). Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.



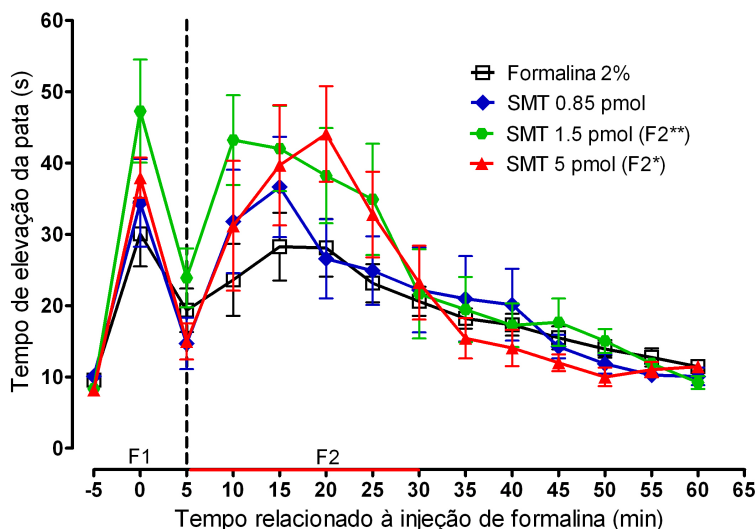
#### 4.7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE SUMATRIPTANO COMBINADO À FORMALINA NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO.

Após a observação de que os receptores 5-HT<sub>1-3</sub> possuem participação nos efeitos causados pela formalina intra-articular, verificamos a possível influência do agonista 5-HT<sub>1</sub>, sumatriptano, na incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático induzidos por formalina.

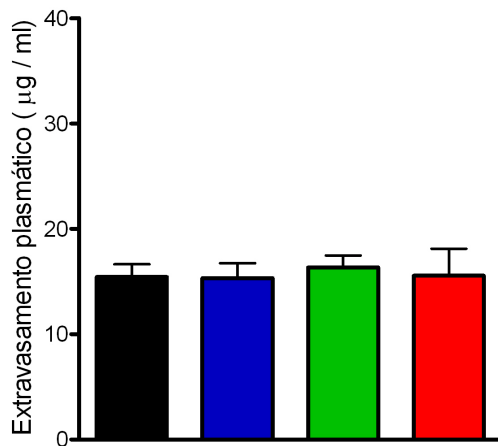
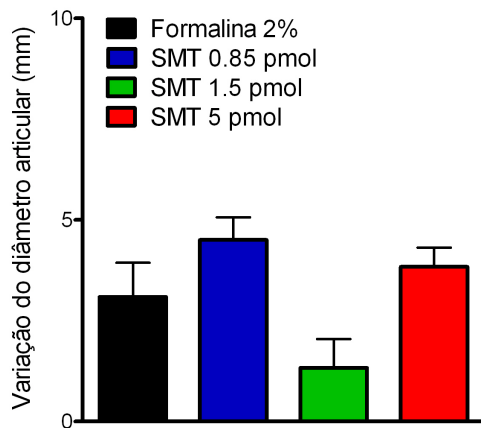
As doses testadas (0.85, 1.5 e 5 pmol) foram escolhidas de acordo com a constante de dissociação (K<sub>d</sub>) dos receptores 5-HT<sub>1</sub> ao sumatriptano (PEROUTKA e McCARTHY, 1989).

As duas maiores doses (1.5 e 5 pmol) foram capazes de aumentar o efeito nociceptivo causado pela formalina somente na segunda fase (gráfico 13).

Nenhuma dose testada foi capaz de alterar o diâmetro articular ou o extravasamento plasmático (gráfico 14) em comparação ao grupo controle (formalina 2%).



**Gráfico 13 – Efeito do sumatriptano combinado à formalina no teste de incapacitação articular.** As doses 1.5 e 5 pmol causaram hipernocicepção somente na segunda fase em comparação ao grupo controle (formalina 2%). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \* e \*\* representam a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , respectivamente. Para análise estatística de F1 (0 min) foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *Dunnett*. Para análise de F2 (5-30 min, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnett*. A injeção intra-articular foi aplicada no tempo 0 min. O tempo -5 min indica o valor de deambulação dos animais em estado normal. Os códigos F1 e F2 simbolizam a primeira e segunda fase do teste, respectivamente.



**Gráfico 14 – Efeito do sumatriptano combinado à formalina na variação de edema e extravasamento articular.** Nenhuma dose testada foi capaz de alterar o diâmetro articular (acima) ou o extravasamento plasmático (abaixo) em comparação ao grupo controle (formalina 2%). Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

#### 4.8 INFLUÊNCIA DOS MASTÓCITOS NA HIPERNOCICEPÇÃO GERADA PELA COMBINAÇÃO SUMATRIPTANO/FORMALINA.

Passamos a investigar os possíveis mecanismos responsáveis pelo aumento do comportamento nociceptivo gerado pelo sumatriptano associado à formalina. Dentro dessa linha, para pesquisarmos o envolvimento dos mastócitos utilizamos o estabilizador de membrana cromoglicato de sódio. Para tal, fizemos uso de dose (1.6 mg) previamente utilizada em estudos de nosso grupo (SOUZA-SILVA, 2009).

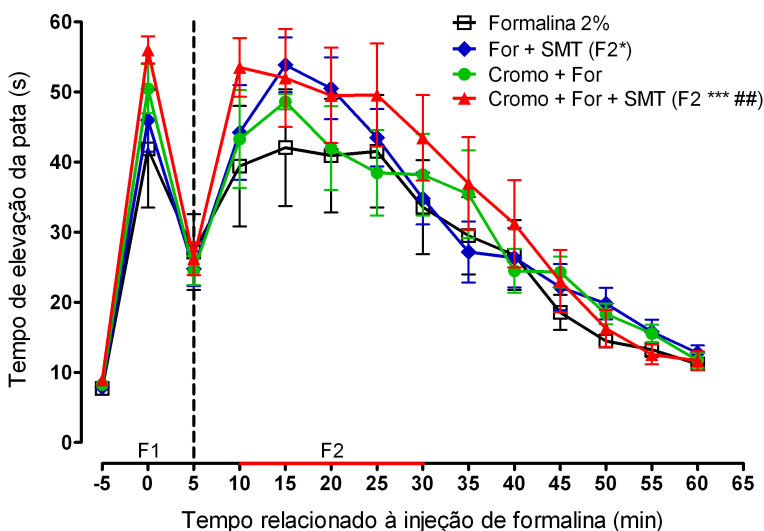
Assim como nos experimentos anteriores, todas as substâncias utilizadas foram injetadas de maneira isolada ou em combinação pela via intra-articular.

Para controle positivo deste experimento foi escolhida a dose de 1.5 pmol de sumatriptano associada à formalina 2%. Essa combinação mais uma vez mostrou-se hipernociceptiva em relação ao grupo formalina 2% na segunda fase do teste.

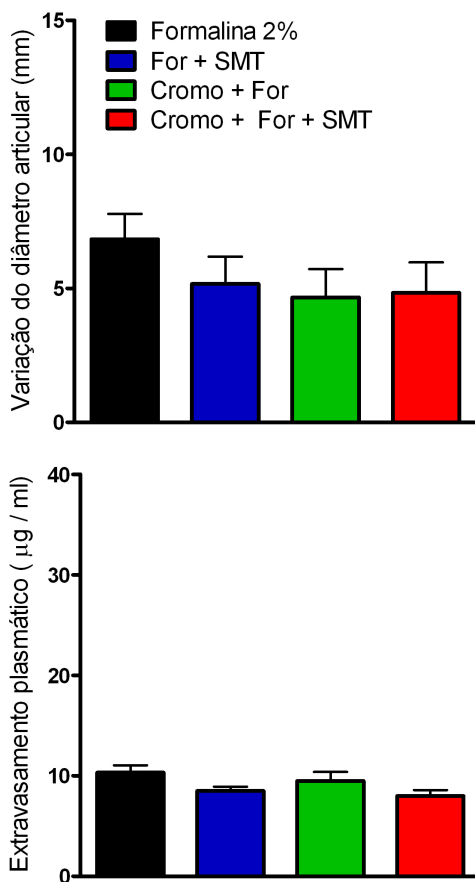
Conforme esperado, a associação de cromoglicato de sódio (1.6 mg) com formalina não foi capaz de alterar o comportamento nocifensivo em relação ao grupo formalina 2%.

A combinação entre cromoglicato de sódio (1.6 mg), sumatriptano (1.5 pmol) e formalina (2%) causou hipernocicepção em relação ao grupo formalina (2%) e ao grupo cromoglicato de sódio (1.6 mg) combinado à formalina (2%) na segunda fase. Já em relação ao grupo sumatriptano (1.5 pmol) combinado à formalina (2%) não houve diferença conforme demonstrado no gráfico 15.

Todos os grupos experimentais comportaram-se de maneira similar quanto à variação de diâmetro articular e extravasamento plasmático (gráfico 16).



**Gráfico 15 – Efeito do cromoglicato de sódio na combinação sumatriptano/formalina na incapacitação articular.** O grupo formalina 2% + sumatriptano 1.5 pmol (For + SMT) gerou hipernocicepção em relação ao grupo formalina 2% na segunda fase (F2 \*). O grupo cromoglicato de sódio 1.6 mg + formalina 2% + sumatriptano 1.5 pmol (Cromo + For + SMT) gerou hipernocicepção comparado ao grupo formalina 2% (F2 \*\*\*) e ao grupo cromoglicato de sódio 1.6 mg + formalina 2% (Cromo + For) (F2 ##). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \*, ## e \*\*\* representam a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente. Para análise estatística de F1 (0 min) foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *Tukey*. Para análise de F2 (10-30 min, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Tukey*. A injeção intra-articular foi aplicada no tempo 0 min. O tempo -5 min indica o valor de deambulação dos animais em estado normal. Os códigos F1 e F2 simbolizam a primeira e segunda fase do teste, respectivamente.



**Gráfico 16 – Efeito do cromoglicato de sódio na combinação sumatriptano/formalina sobre a variação de edema e extravasamento plasmático.** Nenhum grupo testado diferiu o diâmetro articular (acima) ou o extravasamento plasmático (abaixo) em suas comparações. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Tukey*.

#### 4.9 INFLUÊNCIA DE PROSTAGLANDINAS NA HIPERNOCICEPÇÃO GERADA PELA COMBINAÇÃO SUMATRIPTANO/FORMALINA.

Para esclarecer se há participação de prostaglandinas no efeito hipernociceptivo gerado pela combinação sumatriptano/formalina, utilizamos o anti-inflamatório não esteroidal indometacina em dose (2.5 mg/kg) previamente utilizada em estudos de nosso grupo (BRESSAN e TONUSSI, 2008).

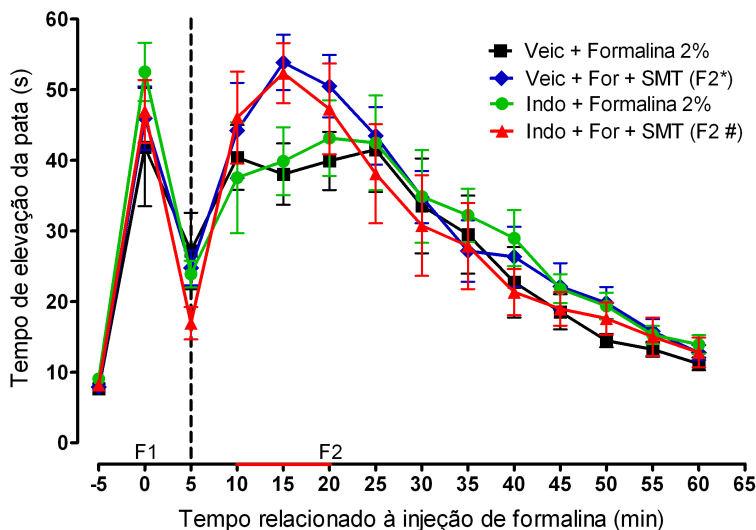
Neste experimento, indometacina ou veículo (bicarbonato de sódio a 1.29%) foram injetados via intra-peritoneal uma hora antes da injeção intra-articular.

Dentre os grupos veículo, o grupo que recebeu a combinação intra-articular de sumatriptano (1.5 pmol) e formalina (2%) demonstrou hipernocicepção em relação ao grupo formalina 2%.

Na comparação entre os grupos tratados com indometacina percebemos que a combinação intra-articular de sumatriptano (1.5 pmol) e formalina (2%) também manteve o perfil hipernociceptivo em relação ao grupo que somente recebeu formalina 2%.

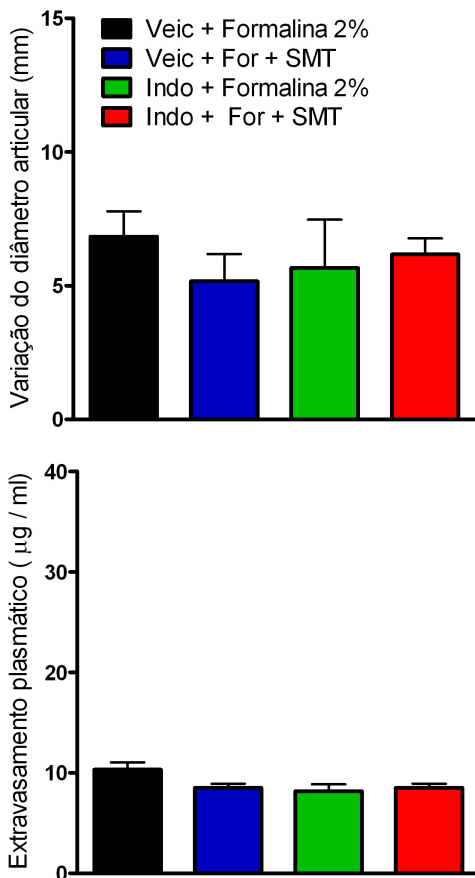
Entre os grupos que receberam a mesma solução intra-articular não houve diferença de comportamento nociceptivo conforme demonstra o gráfico 17.

Em relação à variação de diâmetro articular e extravasamento plasmático não houve diferença entre os grupos testados (gráfico 18).



**Gráfico 17 – Efeito da indometacina na combinação sumatriptano/formalina no teste de incapacitação articular.** O grupo veículo (bicarbonato de sódio a 1,29%; i.p.) que recebeu a combinação intra-articular sumatriptano 1.5 pmol e formalina 2% (Veic + For + SMT) foi hipernociceptivo em relação ao grupo veículo que recebeu somente formalina intra-articular (Veic + Formalina 2%) na segunda fase (F2 \*). O grupo indometacina (2.5 mg/kg; i.p.) que recebeu a combinação sumatriptano 1.5 pmol e formalina 2% (Indo + For + SMT) foi hipernociceptivo em relação ao grupo indometacina que recebeu somente formalina intra-articular (Indo + Formalina 2%) na segunda fase (F2 #). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \* e # representam a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0,05$ . Para análise estatística de F1 (0 min) foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *Tukey*. Para análise de F2 (10-20 min, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Tukey*. A injeção intra-articular foi aplicada no tempo 0 min. O tempo -5 min indica o valor de deambulação dos animais em estado normal. Os códigos F1 e F2 simbolizam a primeira e segunda fase do teste, respectivamente.





**Gráfico 18 - Efeito da indometacina na combinação sumatriptano/formalina sobre a variação de edema e extravasamento plasmático.** Nenhum grupo testado diferiu o diâmetro articular (acima) ou o extravasamento plasmático (abaixo) em suas comparações. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Tukey*.

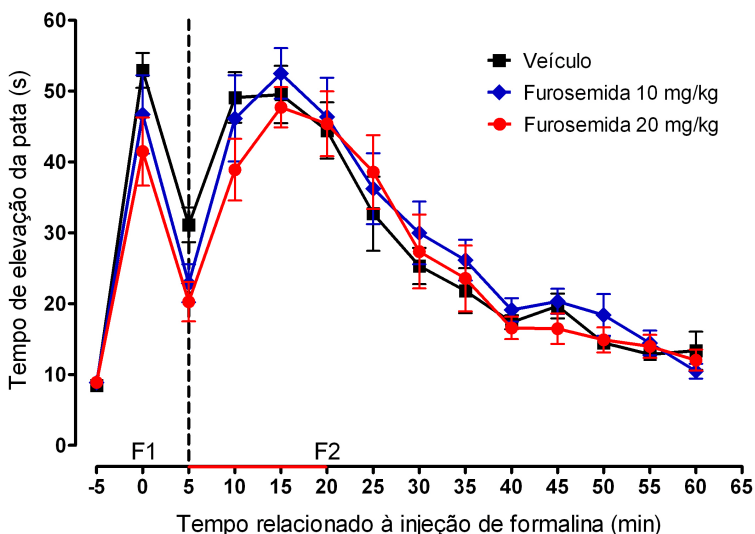
#### 4.10 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE FUROSEMIDA COMBINADA À FORMALINA NA NOCICEPÇÃO, EDEMA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO.

Passamos a investigar a possibilidade dos co-transportadores de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  estarem relacionados com a hipernocicepção causada pela combinação de sumatriptano/formalina. Para tal, utilizamos a droga furosemida, um bloqueador destes co-transportadores.

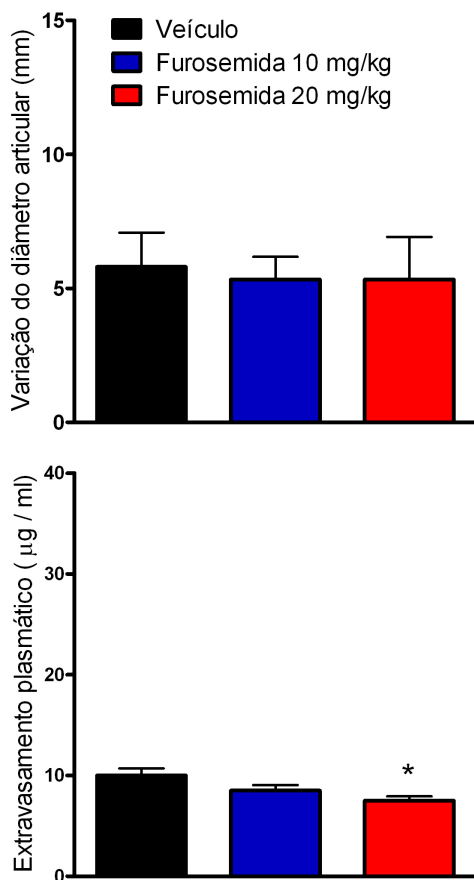
Inicialmente, objetivando escolher a dose com melhor perfil para a continuidade dos experimentos, testamos 10 e 20 mg/kg de furosemida. Tais doses, assim como o veículo (bicarbonato de sódio a 1,29%), foram administradas via intra-peritoneal uma hora antes da injeção intra-articular de formalina 2%.

Nenhuma dose testada foi capaz de alterar o comportamento nociceptivo em relação ao grupo controle (veículo), conforme demonstra o gráfico 19. Contudo, a maior dose (20 mg/kg) foi capaz de diminuir o extravasamento plasmático em relação ao grupo controle (gráfico 20).

Não houve diferença na variação de diâmetro articular entre os grupos.



**Gráfico 19 – Efeito da furosemida no teste de incapacitação articular induzido por formalina.** Nenhuma dose testada foi capaz de alterar o comportamento nociceptivo induzido pela formalina 2%. Para análise estatística de F1 (0 min) foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *Dunnet*. Para análise de F2 (5-20 min, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet*. A injeção intra-articular foi aplicada no tempo 0 min. O tempo -5 min indica o valor de deambulação dos animais em estado normal. Os códigos F1 e F2 simbolizam a primeira e segunda fase do teste, respectivamente.



**Gráfico 20 – Efeito da furosemida na variação de edema e extravasamento plasmático induzidos por formalina 2%.** Nenhuma dose modificou o diâmetro articular (acima) em comparação ao grupo controle (veículo). A maior dose (20 mg/kg) de furosemida foi capaz de reduzir o extravasamento plasmático (abaixo). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM e \* representa a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0.05$ . Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

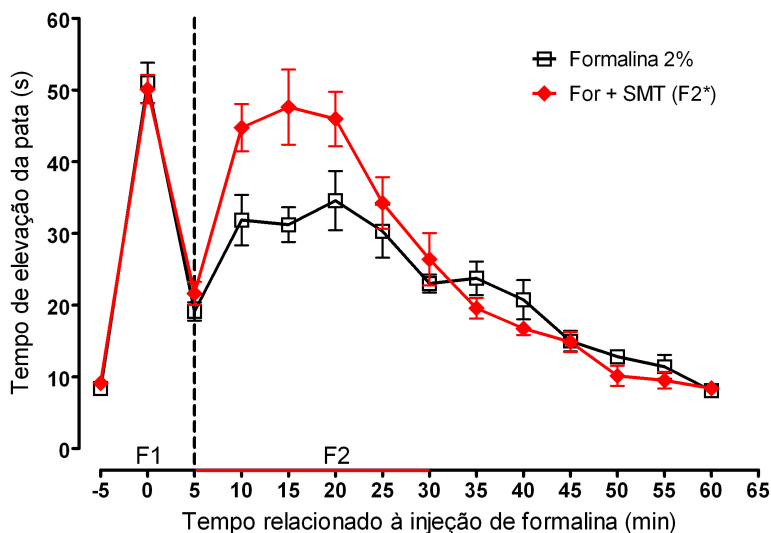
#### 4.11 INFLUÊNCIA DOS CO-TRANSPORTADORES $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ NA HIPERNOCICEPÇÃO GERADA PELA COMBINAÇÃO SUMATRIPTANO/FORMALINA.

Após análise do experimento anterior, optamos por utilizar a dose de 20 mg/kg de furosemida que mostrou atuar de maneira satisfatória.

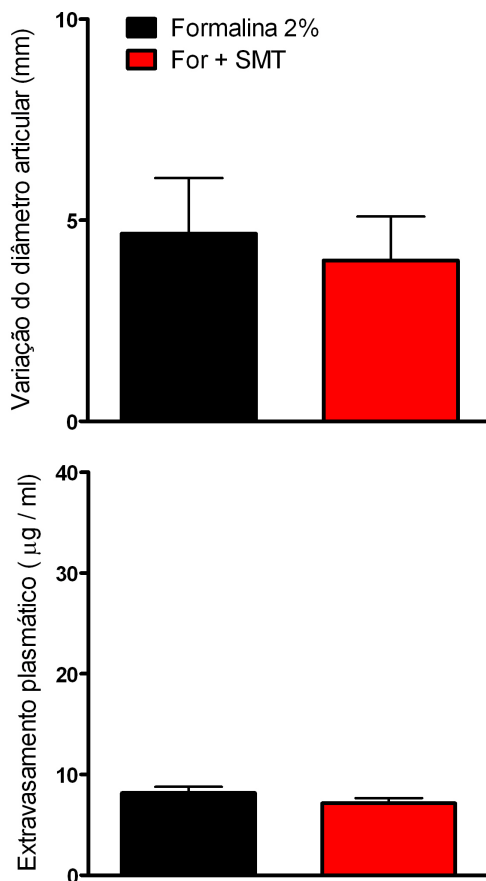
Uma hora antes da injeção intra-articular de formalina 2% ou da combinação sumatriptano 1.5 pmol e formalina 2%, ambos os grupos receberam a dose escolhida de furosemida via intra-peritoneal.

A combinação sumatriptano/formalina gerou aumento do comportamento nociceptivo na segunda fase do teste comparado ao grupo que recebeu somente formalina (gráfico 21).

Não houve diferença de diâmetro articular ou extravasamento plasmático entre os grupos (gráfico 22).



**Gráfico 21 – Efeito da furosemda na combinação sumatriptano/formalina no teste de incapacitação articular.** A combinação sumatriptano 1.5 pmol com formalina 2% gerou hipernocicepção em relação ao grupo que recebeu somente formalina 2% na segunda fase do teste. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. \* representa a diferença estatística significativa ao nível de  $P < 0,05$ . Para análise estatística de F1 (0 min) e F2 (5-30 min, linha vermelha) foi utilizado teste t não pareado. A injeção intra-articular foi aplicada no tempo 0 min. O tempo -5 min indica o valor de deambulação dos animais em estado normal. Os códigos F1 e F2 simbolizam a primeira e segunda fase do teste, respectivamente.



**Gráfico 22 – Efeito da furosemida na combinação sumatriptano/formalina sobre a variação de edema e extravasamento plasmático.** Não houve diferença de diâmetro articular (acima) ou extravasamento plasmático (abaixo) entre os grupos. Para análise estatística foi utilizado teste t não pareado.

## 5 DISCUSSÃO

Inicialmente demonstramos neste estudo duas particularidades da serotonina articular. A primeira deve-se à sua inabilidade de promover nocicepção na ausência de outro estímulo nocifensivo associado, ao passo de que sua influência sobre a vasculatura mostra-se ativa. A segunda demonstra sua capacidade, ao menos via receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, de causar aumento do comportamento nociceptivo induzido pela formalina na articulação.

Ao avaliarmos o efeito da serotonina sozinha na articulação percebemos que os animais deambularam normalmente, sem demonstrar qualquer alteração. Este achado vai de encontro a experimentos comportamentais (TAIWO e LEVINE, 1992; TAMBELI et al., 2006) onde a injeção de 5-HT sozinha no tecido subcutâneo promoveu nocicepção, e eletrofisiológicos (HERBERT e SCHMIDT, 1992) onde foi observada ativação de fibras aferentes do tipo A $\delta$  e C em joelhos de gatos normais submetidos à injeção de 5-HT sem outro estímulo associado. Contudo, ao compararmos as dosagens utilizadas em nosso experimento aos estudos citados percebemos uma enorme discrepância. Herbert e Schmidt, por exemplo, demonstram que a menor dose capaz de gerar ativação dos nociceptores é 35 vezes superior a nossa maior dose utilizada (100 nmol). Já em relação ao trabalho publicado por Tambeli e colaboradores, o valor passa a ser 1930 vezes superior para que haja a observação de comportamentos nociceptivos. Tais valores mostram-se muito superiores aos encontrados até mesmo em articulações acometidas por diferentes doenças (ALSTERGREN e KOPP, 1997), e sendo assim, possivelmente não reflitam a realidade que ocorre nestas afecções.

Por outro lado, diversos trabalhos demonstram que a 5-HT parece ser mais potente em aumentar o efeito nociceptivo de outros mediadores do que em induzir tais efeitos por si só (ABOTT et al., 1996; KRESS et al., 1997). Pudemos comprovar tal fato obtendo hipernocicepção com a combinação de 5-HT (100 nmol) e formalina em ambas as fases do teste.



Em relação aos eventos vasculares causados pela 5-HT, sabe-se que podem ocorrer tanto pela ativação direta de seus receptores localizados no próprio vaso (LINDER et al., 2007) como de maneira indireta, por meio da interferência serotoninérgica no controle simpático (FINK e GÖTHERT, 2007) da vasculatura. O envolvimento de terminais simpáticos na inflamação deve-se à liberação de outros transmissores além da norepinefrina. Dentre esses citamos o ATP, neuropeptídeo Y e prostaglandinas pela capacidade de produzir e/ou aumentar os eventos vasculares locais (CODERRE et al., 1989). Especificamente na articulação do joelho, a 5-HT parece induzir extravasamento plasmático através da ativação de receptores 5-HT<sub>2A</sub> em terminais eferentes simpáticos (PIERCE et al., 1995).

Desta forma, ainda que de maneira inespecífica, o edema e extravasamento plasmático causados pela 5-HT aplicada sozinha na articulação ocorreram conforme o esperado. Já na combinação com formalina, somente a maior dose gerou aumento do edema articular sem que desta vez houvesse alteração de extravasamento plasmático. Acreditamos que tal fato ocorreu pelo motivo de a formalina já causar efeito suficientemente intenso, o qual a 5-HT parece ser incapaz de potencializar ao menos na dosagem testada.

Muitos receptores de 5-HT na periferia estão envolvidos nos eventos gerados após a injeção de formalina (DOAK e SAWYNOK, 1997; KAYSER et al., 2007). Alguns possíveis receptores relacionados a esta questão são o 5-HT<sub>1A</sub> (TAIWO e LEVINE, 1992; OKAMOTO et al., 2005), 5-HT<sub>1B</sub> (WOTHERSPOON et al., 2000), 5-HT<sub>1D</sub> (POTREBIC et al., 2003), 5-HT<sub>2A</sub> (RUEFF e DRAY, 1992; TOKUNAGA et al., 1998; OKAMOTO et al., 2002) e 5-HT<sub>3</sub> (GIORDANO e ROGERS, 1989; OKAMOTO et al., 2004).

O receptor 5-HT<sub>1A</sub> é caracterizado pela sua importância no controle da dor em nível central (COLPAERT, 2006; PAVLAKOVIC et al., 2009), sendo classificado como um subtipo de receptor inibitório acoplado à proteína G (DESEURE et al., 2007). Já em nível periférico, resultados de estudos demonstram o papel hipernociceptivo deste receptor (DOAK e SAWYNOK, 1997; PARADA et al., 2001). Da mesma forma, nossos resultados mostraram que a administração de NAN-190,

antagonista seletivo do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, somente causou hiponocicepção na segunda fase do teste de formalina.

O que chama atenção nestes achados é o fato de um receptor inibitório quando ativado ser capaz de causar hipernocicepção.

Seguindo este fato, Taiwo e colaboradores (1992) sugerem que em terminais periféricos de fibras aferentes o receptor 5-HT<sub>1A</sub> está positivamente relacionado ao sistema de segundo mensageiro AMPc. Tal observação leva a crer que por meio deste mecanismo a 5-HT possa causar nocicepção através deste receptor, tido como periféricamente estimulador.

Sendo assim acreditamos que a administração intra-articular do NAN 190 seja capaz de impedir a cascata de eventos ocasionada pela ativação do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, resultando na hiponocicepção observada.

Os receptores 5-HT<sub>2A</sub> tem grande contribuição em diversos tipos de dor inflamatória (WEI et al., 2005; SASAKI et al., 2006) assim como em diferentes afecções articulares (KLING et al., 2006; OKAMOTO et al., 2005), onde seu bloqueio atenua os sinais e sintomas associados à lesão e inflamação sinovial (PIERCE et al., 1995; XIE et al., 2008; HONG et al., 2006). Trata-se de um subtipo de receptor positivamente acoplado à proteína G, tendo como segundo mensageiro o mecanismo da PLC.

Conforme a literatura, nossos resultados mostram que a administração de ciproheptadina, antagonista 5-HT<sub>2A</sub>, promoveu hiponocicepção na segunda fase do teste.

Contudo, de maneira inesperada, nenhuma dose utilizada foi capaz de atenuar os eventos vasculares causados pela formalina, e de maneira ainda mais surpreendente, a maior dose (1500 fmol) causou aumento do extravasamento plasmático.

A formalina promove seus efeitos vasculares por diferentes mecanismos que em comum causam a estimulação de células não neuronais e neuronais. Em resposta à estimulação, ambas as células liberam substâncias inflamatórias ocasionando intenso edema e extravasamento plasmático local. Levando isto em consideração, talvez o bloqueio de somente o receptor 5-HT<sub>2A</sub> não seja suficiente para atenuar as respostas

conseqüentes à aplicação de formalina. Talvez por conta disso não pudemos observar os efeitos inibitórios da ciproheptadina.

No caso do aumento do extravasamento plasmático observado é incerto afirmar por qual mecanismo a ciproheptadina esteja atuando, já que aos 1500 fmol esta droga possui *binding* por diferentes receptores. Nessa linha, percebemos que os receptores dopaminérgicos D2 são fortes candidatos (YOUNG et al., 2005). Suportando esta hipótese, sabe-se que a ativação dos receptores D2 periféricos é capaz de inibir a inflamação neurogênica e reflexos pró-inflamatórios (PEIZER et al., 2005). Desta forma, ao bloquear este receptor, a ciproheptadina estaria facilitando a ocorrência de extravasamento plasmático conforme observado. Sabe-se que o bloqueio do D2 na periferia não interfere na nocicepção (PELISSIER et al., 2006), e por isso acreditamos não ter ocorrido influência na incapacitação articular.

A ativação serotoninérgica via receptor 5-HT<sub>3</sub> foi estabelecida tanto em situações de lesões agudas (TAMBELI et al., 2006;) quanto crônicas (OKAMOTO et al., 2004), onde em ambas é gerado comportamento nociceptivo. Diferentemente de todos os outros tipos de receptores serotoninérgicos conhecidos, o 5-HT<sub>3</sub> é membro da superfamília dos canais iônicos regulados por ligantes (MARICQ et al., 1991), e sendo assim, quando ativados são capazes de provocar despolarização de nociceptores (MILLAN, 2002). Desta maneira e conforme esperado, a administração de ondansetrona, antagonista seletivo 5-HT<sub>3</sub>, foi capaz de causar hiponocicepção. Contudo, este efeito restringiu-se também somente à segunda fase do teste.

Até o momento nenhum antagonista foi capaz de atenuar a primeira fase do teste de formalina. Por se tratar de um período creditado à estimulação neuronal direta, esperava-se que ao menos o único receptor ionotrópico serotoninérgico, quando bloqueado, fosse capaz de gerar hiponocicepção.

Todavia, acreditamos que a explicação para este fato não ter ocorrido pode ser apenas uma questão temporal.

Em um trabalho realizado por Nakajima e colaboradores (2009), foi visto que a concentração de 5-HT no tecido subcutâneo estimulado com formalina 2.5% somente iniciou a aumentar a partir dos 12 minutos, tendo pico aos 18 minutos e retornando ao nível basal passados 36 minutos. Levando-se em

consideração que nossa concentração é similar (2%), acreditamos que em nosso experimento a 5-HT também não possua participação na primeira fase do teste de formalina, e sendo assim, o bloqueio serotoninérgico não deve causar efeito. Esta informação vai de encontro a trabalhos onde foi observada inibição da primeira fase com o uso de antagonistas serotoninérgicos (DOAK e SAWYNOK, 1997; PARADA et al., 2001). Uma possível razão para estes achados é a afinidade destas drogas por outros receptores que podem contribuir com a nocicepção. Como exemplo, o antagonista de receptor 5-HT<sub>2A</sub> cetanserina também bloqueia o receptor adrenérgico  $\alpha_1$ , contribuinte para a nocicepção da primeira fase do teste de formalina (HONG e ABBOTT, 1996).

Outro fato interessante a ser colocado é a ausência de redução de edema e extravasamento plasmático nos tratamentos realizados. Com exceção do bloqueio sobre o receptor 5-HT<sub>2A</sub>, previamente discutido, este fato era esperado, visto que a administração intra-articular de drogas seletivas para os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>3</sub> não foi capaz de modificar os níveis de extravasamento plasmático induzido por serotonina em estudo prévio (PIERCE et al., 1995).

A partir dos resultados obtidos com os antagonistas, testamos a possibilidade de haver também a influência dos receptores 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub> no teste de formalina articular pela utilização do agonista 5-HT<sub>1</sub> sumatriptano.

Além de possuir alta afinidade para os receptores citados, a escolha deste triptano deve-se à sua vasta utilização clínica (LINDE et al., 2006). Os mecanismos de ação do sumatriptano na migrânea, sua principal aplicação, não estão completamente definidos. Contudo, acredita-se basicamente em duas teorias. A primeira seria a vasoconstrição gerada a partir da ativação de receptores 5-HT<sub>1B</sub> no músculo liso das artérias coronárias e da dura-máter (LIMMROTH et al., 1996). A segunda é a inibição da transmissão de informações nociceptivas nos terminais centrais de aferentes do nervo trigêmeo, o que levaria a redução da liberação de neurotransmissores (NIKAI et al., 2008).

Desta forma, acredita-se que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1B/D</sub> é capaz também de reduzir a inflamação neurogênica na dura-máter pelo bloqueio da liberação de neuropeptídeos

(DURHAM e RUSSO, 2003). Esta idéia aliada a recente descoberta da presença destes receptores em aferentes primários incita a possibilidade de haver efeitos também na periferia.

Nesta primeira avaliação dos receptores 5-HT<sub>1B/D</sub> no tecido articular, percebemos que nossos resultados se demonstraram contrários aos efeitos conhecidos do sumatriptano em nível central.

No nosso modelo, observamos que a menor dose (0.85 pmol) não alterou o comportamento nociceptivo. De acordo com a constante de dissociação ( $K_d$ ) (PEROUTKA e McCARTHY, 1989), esta dose é seletiva para o receptor 5-HT<sub>1D</sub>, expresso somente em fibras de grande calibre como as do tipo A $\beta$ , não nociceptores. Já as maiores doses (1.5 e 5 pmol) atuam sobre os receptores 5-HT<sub>1B/D</sub> e 5-HT<sub>1B/D/A</sub>, respectivamente. Sabe-se que estes receptores são expressos em fibras de médio e pequeno calibre como as do tipo A $\delta$  e C, nociceptores (NICHOLSON et al., 2003). Tomados em conjunto, estes dados nos levam a crer que a ativação dos receptores localizados em fibras nociceptivas foi capaz de gerar a hipernocicepção observada na segunda fase do teste. Acreditamos ainda que a ativação de qualquer subtipo de receptor 5-HT<sub>1</sub> não seja capaz de influenciar a primeira fase do teste de formalina.

Neste mesmo experimento não foram observadas alterações de edema ou extravasamento plasmático. Apesar da expectativa de que tais modificações pudessem ocorrer, Pierce e colaboradores (1995) já haviam observado que a administração intra-articular de sumatriptano era incapaz de alterar o extravasamento plasmático basal.

Aparentemente para que haja efeito vascular na periferia, o sumatriptano deve ter abrangência sistêmica (GOADSBY et al., 2002) e sendo assim, certamente nossas doses, muito reduzidas, ficaram à margem de tal possibilidade. Com isso esperamos ter confirmado que os eventos vasculares gerados pela serotonina na articulação são ocasionados a partir de outro(s) receptor(es) que não o 5-HT<sub>1B</sub> ou D.

Após analisarmos estes resultados e levarmos em consideração as possibilidades de atuação conhecidas do

sumatriptano, uma pergunta permanece sem resposta: Por qual mecanismo de ação o sumatriptano causou hipernocicepção?

Inicialmente pensamos na possibilidade desta droga influenciar os mastócitos a liberar mais serotonina. Esta idéia surgiu ao analisarmos que a degranulação mastocitária é inibida pela ativação do segundo mensageiro AMPc (HILL et al., 1997). Até onde se sabe os receptores 5-HT<sub>1B/D</sub> são negativamente ligados a este mecanismo, o que os torna candidatos a promover a degranulação.

A escolha dos mastócitos deveu-se ao fato de serem as principais células responsáveis pela liberação de 5-HT no tecido periférico, visto que após a utilização de cromoglicato, estabilizador da membrana destas células, ocorreu inibição completa da liberação de serotonina após a injeção de formalina (NAKAJIMA et al., 2009).

Os resultados do nosso experimento demonstram que o cromoglicato não causou alterações em nenhum parâmetro avaliado, o que inicialmente nos leve a desconfiar que sua dose não esteja adequada. Contudo, experimentos anteriores de nosso grupo (SOUZA-SILVA, 2009) e de outros (PARADA et al., 2001; NAKAJIMA et al., 2009) mostram que a dose escolhida (1.6 mg; i.a.) é suficiente para causar seu efeito estabilizador. Isto nos permite afirmar que o sumatriptano não atua sobre mastócitos causando aumento da liberação de 5-HT ou outra substância algogênica na articulação, já que seus efeitos hipernociceptivos foram mantidos mesmo com o bloqueio desta célula.

Indo adiante, passamos a avaliar a possibilidade de prostaglandinas estarem envolvidas com a hipernocicepção causada pelo sumatriptano.

As prostaglandinas, em particular a PGE<sub>2</sub>, contribuem para a sensibilização de nociceptores e mecanorreceptores de tecidos inflamados como as articulações durante diversas afecções (SCHAIBLE e SCHMIDT, 1988). Além disso, conforme comentado anteriormente, a ativação de receptores serotoninérgicos em aferentes primários é capaz de potencializar os efeitos de outros mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas. Sendo assim, utilizamos a indometacina, um

anti-inflamatório não esteroideal capaz de bloquear a síntese das prostaglandinas para testar essa hipótese.

Nossos resultados demonstram que aparentemente também não há envolvimento de componentes inflamatórios específicos na hipernocicepção causada pelo sumatriptano, já que a indometacina (2.5 mg/kg; i.p.) foi incapaz de atenuar os efeitos causados pela combinação sumatriptano/formalina.

Por fim, resolvemos testar se os co-transportadores de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  (NKCC) poderiam ter participação.

Sob condições normais, os NKCC localizados nas fibras nociceptivas são responsáveis por manter a concentração do íon cloro acima do equilíbrio eletroquímico. Este gradiente elevado permite que ocorra despolarização com a abertura dos canais de cloro acoplados ao receptor  $\text{GABA}_A$ , que causa a saída destes íons do nociceptor (WILLIS, 1999). Como este fenômeno faz com que um mediador normalmente inibitório, o GABA, se torne excitatório, procuramos avaliar se de alguma forma o sumatriptano poderia estar se valendo desta característica dos nociceptores para também ter um efeito sensibilizante.

Para avaliarmos a contribuição dos NKCC na combinação sumatriptano/formalina inicialmente testamos qual seria a melhor dosagem de furosemida, droga bloqueadora destes co-transportadores, no teste de formalina articular. Percebemos que nenhuma dose alterou a nocicepção, contudo a maior (20 mg/kg; i.p.) reduziu o extravasamento plasmático. Acreditamos que este efeito tenha ocorrido pelo bloqueio do reflexo da raiz dorsal, já que a furosemida nesta dose não é capaz de diminuir a pressão sanguínea do animal, fato que poderia reduzir também o extravasamento plasmático (SUEDEKUM, 2001).

Por conta deste resultado a dose de 20 mg/kg foi escolhida para o próximo experimento.

Finalmente bloqueamos a participação dos NKCC e desta vez submetemos a articulação à combinação de sumatriptano/formalina. Como resultado, mais uma vez obtivemos a hipernocicepção como resposta na segunda fase do teste sem que alterações vasculares fossem percebidas. Tal fato nos leva a crer que o mecanismo implicado pelas atuações dos NKCC também não seja o utilizado pelo sumatriptano no aumento do comportamento nociceptivo em nível periférico.

Desta forma, parece que nenhum dos três mecanismos propostos faz parte dos utilizados pelo sumatriptano para causar hipernocicepção.

Uma das possíveis explicações restantes para o efeito hipernociceptivo desta droga é o compartilhamento das mesmas vias celulares dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> na periferia, conforme previamente discutido. Sabe-se que os subtipos do receptor 5-HT<sub>1</sub> possuem grande homologia entre si, e desta forma os receptores 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub> possivelmente também sejam positivamente relacionados ao sistema de segundo mensageiro AMPc, de forma que sua ativação seja capaz de causar a observada hipernocicepção em nível periférico.



## 6 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que a participação da serotonina na nocicepção do tecido articular, assim como em outros tecidos periféricos, parece estar condicionada somente a situações onde haja mecanismos relacionados à lesão. Enquanto isso, para que ocorram eventos vasculares, aparentemente basta haver serotonina em concentração pouco acima da fisiológica na articulação.

Dentre os possíveis receptores, ao menos o 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> participam dos eventos hipernociceptivos serotoninérgicos na segunda fase do teste de formalina, sendo que aparentemente esta participação não vem acompanhada de eventos vasculares.

Por conta disso, acreditamos que a prescrição de antagonistas serotoninérgicos para pacientes com artrite possa ser uma alternativa terapêutica desde que tais drogas possuam ação exclusivamente periférica, já que antagonistas com ação central, como ondansetrona e metisergida, podem piorar a dor por inibir o sistema analgésico endógeno.

Podemos ainda concluir que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1B/D</sub> possa causar hipernocicepção em tecidos periféricos por mecanismo ainda não definido, tendo como forte candidato a estimulação de AMPc nos mecanismos celulares neuronais.

Dentre as maneiras de avaliar esta idéia, uma opção seria administrar um inibidor de adenilato ciclase, enzima catalisadora da formação de AMPc, juntamente à combinação sumatriptano/formalina. A perda do efeito hipernociceptivo do sumatriptano neste experimento seria uma forte evidência do acoplamento positivo entre receptores 5-HT<sub>1</sub> e adenilato ciclase na periferia.

Ainda que não existam relatos clínicos na literatura sobre pacientes reclamarem de dor articular após o uso de sumatriptano, acreditamos nesta possibilidade principalmente naqueles acometidos por alguma afecção articular.

## 7 REFERÊNCIAS

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. **World Health Organ Tech Rep Ser**, 919:1-218, 2003.

EPIDEMIOLOGY OF MUSCULOSKELETAL PAIN. Global year of musculoskeletal pain - fact sheets. **IASP**, 2009.

TEIXEIRA M.J., YENG L.T., KAZIYAMA H.H.S. **Dor – Síndrome dolorosa miofascial e dor músculo-esquelética**. São Paulo: Roca, 2006.

LANGFORD L.A. Unmyelinated axon ratios in cat motor, cutaneous and articular nerves. **Neurosci Lett**, 40:19-22, 1983.

LANGFORD L.A., SCHMIDT R.F. Afferent and efferent axons in the medial and posterior articular nerves of the cat. **Anat Rec**, 206:71-78, 1983.

HILDEBRAND C., OQVIST G., BRAX L., TUISKU F. Anatomy of the rat knee joint and composition of a major articular nerve. **Anat Rec**, 229:545-555, 1991.

SCHAIBLE H.G. Neuronal mechanisms of joint pain. **Current topics in pain: 12<sup>th</sup> world congress on pain**. Seattle: IASP press, 2009.

LOESER J.D., TREEDE R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, 137:473-7, 2008.

McDOUGALL J.J. Arthritis and pain: Neurogenic origins of joint pain. **Arthritis Res Ther**, 8:220, 2006.

FLAKE N.M., GOLD M.S. Inflammation alters sodium currents and excitability of temporomandibular joint afferents. **Neurosci Lett**, 384:294-9, 2005.

SCHAIBLE H.G. Basic mechanisms of deep somatic pain. **Text book of pain**, 5<sup>th</sup> edition. Elsevier, 2006.

HORIGOME K., PRYOR J.C., BULLOCK E.D., JOHNSON E.M. Jr. Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. **J Biol Chem**, 268:148881-7, 1993.

DRAY A., URBAN L., DICKENSON A. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol Sci**, 15:190-7, 1994.

NIGROVIC P. A., LEE D. M. Mast cells in inflammatory arthritis. **Arthritis Res Ther**, 7:1-11, 2004.

SLUKA K.A. **Mechanisms and management of pain for the physical therapist**. Seattle: IASP press, 2009.

KUSHNIR-SUKHOV N.M., BROWN J.M., WU Y., KIRSHENBAUM A., METCALFE D.D. Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. **J Allergy Clin Immunol**, 119:498-9, 2007.

RINGVALL M., RÖNNBERG E., WERNERSSON S., DUELLI A., HENNINGSSON F., ABRINK M., GARCÍA-FAROLDI G., FAJARDO I., PEJLER G. Serotonin and histamine storage in mast cell secretory granules is dependent on serglycin proteoglycan. **J Allergy Clin Immunol**, 121:1020-6, 2008.

GILFILLAN A.M., TKACZYK C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. **Nat Rev Immunol**, 6:218-30, 2006.

PIETRUCK C., GROND S., XIE G.X., PALMER P.P. Local anesthetics differentially inhibit sympathetic neuron-mediated and C fiber-mediated synovial neurogenic plasma extravasation. **Anesth Analg**, 96:1397-402, 2003.

WHITAKER-AZMITIA P.M. The Discovery of serotonin and its role in neuroscience. **Neuropsychopharm**, 21:2S-8S, 1999.

AZIMITIA E.C.: Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity and homeostasis. **Int Rev Neurobiol**, 77:31-56, 2007.

YAKSH T.L., WILSON P.R. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. **J Pharmacol Exp Ther**, 208:446-53, 1979.

DAHER J.B., DE MELO M.D., TONUSSI C.R. Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. **Life Sci**, 76:2349-59, 2005.

ERNBERG M., LUNDEBERG T., KOPP S. Pain and allodynia/hyperalgesia induced by intramuscular injection of serotonin in patients with fibromyalgia and healthy individuals. **Pain**, 85:31-9, 2000.

RUAÑO G., THOMPSON P.D., WINDEMUTH A., SEIP R.L., DANDE A., SOROKIN A., KOCHERLA M., SMITH A., HOLFORD T.R., WU A.H. Physiogenomic association of statin-related myalgia to serotonin receptors. **Muscle Nerve**, 36:329-35, 2007.

OLIVEIRA M.C., PARADA C.A., VEIGA M.C., RODRIGUES L.R., BARROS S.P., TAMBELI C.H. Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. **Eur J Pain**, 9:87-93, 2005.

TING E., ROVERONI R.C., FERRARI L.F., LOTUFO C.M., VEIGA M.C., PARADA C.A., TAMBELI, C.H. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. **Life Sci**, 81:765-71, 2007.

DOAK G.J., SAWYNOK J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neurosci**, 80:939-49, 1997.

SOMMER C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. **Mol Neurobiol**, 30:117-25, 2004.

SCHAIBLE H.G., GRUBB B.D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. **Pain**, 55; 5-54, 1993.

RODRIGUES L.L., OLIVEIRA M.C., PELEGRINI-DA-SILVA A., DE ARRUDA VEIGA, M.C., PARADA, C.A., TAMBELI, C.H. Peripheral sympathetic component of the temporomandibular joint inflammatory pain in rats. **J Pain**, 7(12):929-36, 2006.

YANGUO H., HAIMING J., HUA, W. Topical ketanserin attenuates hyperalgesia and inflammation in arthritis in rats. **Pain**, 124, 27–33, 2006.

XIE G., WANG Y., SHARMA M., GABRIEL A., MITCHELL J., XING Y., MEUSER T., PALMER P.P. 5-Hydroxytryptamine-induced plasma extravasation in the rat knee joint is mediated by multiple prostaglandins. **Inflamm Res**, 52(1):32-8, 2003.

ANDEN N.E., OLSSON Y. 5-hydroxytryptamine in normal and sectioned rat sciatic nerve. **Acta Pathol Microbiol Scand**, 70:537-540, 1967.

LEHTOSALO J.I., UUSITALO H., LAAKSO J., PALKAMA A., HARKONEN M. Biochemical and immunohistochemical determination of 5-hydroxytryptamine located in mast cells in the trigeminal ganglion of the rat and guinea pig. **Histochem**, 80:219-223, 1984.

ALSTEGREN P., KOPP S. Pain and synovial concentration of serotonin in arthritic temporomandibular joints. **Pain**, 72; 137-143, 1997.

HOYER D., HANNON J.P., MARTIN G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, 71:533-54, 2002.

PIERCE P.A., XIE G.X., PEROUTKA S.J., GREEN P.G., LEVINE J.D. 5-Hydroxytryptamine-induced synovial plasma extravasation is mediated via 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptors on sympathetic efferent terminals. **J Pharmacol Exp Ther**, 275(1):502-8, 1995.

PIERCE P.A., XIE G.X., LEVINE J.D., PEROUTKA S.J. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. **Neurosci**, 70: 553–559, 1996.

NICHOLSON R., SMALL J., DIXON A.K., SPANSWICK D., LEE K. Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. **Neurosci Lett**, 3:119-22, 2003.

BETTEN A., DAHLGREN C., HERMODSSON S. AND HELLSTRAND K. Serotonin protects NK cells against oxidatively induced functional inhibition and apoptosis. **J Leukocyte Biol**. 70: 65-72, 2001.

FREIRE-GARABAL M., NUNEZ M.J., BALBOA J., LOPEZ-DELGADO P., GALLEGRO R., GARCIA-CABALLERO T., FERNANDEZ-ROEL M.D., BRENLLA J., REY-MENDEZ M. Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT1A receptors. **Br J Pharmacol**, 139:457-63, 2003.

IDZKO M., PANTHER E., STRATZ C., MULLER T., BAYER H., ZISSEL G., DURK T., SORICHTER S., DI VIRGILIO F., GEISSLER M. The serotonergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. **J Immunol**, 172:6011–6019, 2004.

BOEHME S.A., LIO F.M., SIKORA L., PANDIT T.S., LAVRADOR K., RAO S.P., SRIRAMARAO D.P. Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin. **J Immunol**, 173:3599–3603, 2004.

BONDESSON L., NORDLIND K., MUTT V., LIDEN S. Inhibitory effect of vasoactive intestinal polypeptide and ketanserin on established allergic contact dermatitis in man. *Acta Derm. Venereol.* 76: 102-106, 1996.

IKEN K., CHHENG S., FARGIN A., GOULET A.C., KOUASSI E. Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte

proliferation through 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Cell Immunol**, 163:1-9, 1995.

ERNBERG M., HEDENBERG-MAGNUSSON B., ALSTERGREN P., LUNDEBERG T., KOPP S. Pain, allodynia, and serum serotonin level in orofacial pain of muscular origin. **J Orofac Pain**, 13:56-62, 1999.

KOPP S. The influence of neuropeptides, serotonin, and interleukin 1 $\beta$  on temporomandibular joint pain and inflammation. **J Oral Maxillofac Surg**, 56:189-91, 1998.

SEIDE M.F., ULRICH-MERZENICH G., FIEBICH B., CANDELARIO-JALIL E., KOCH F.W., VETTER H. Tropisetron inhibits serotonin-induced GE2 release from macrophage-like synovial cells in serum-free tissue culture. **Scand J Rheumatol Suppl** 34:119-33, 2004.

KOHN N.N., HUGHES R.E., McCARTY D.J. Jr, FAIRES J.S. The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients: the "pseudogout syndrome". II. Identification of crystals. **Ann Intern Med**, 56:738-45, 1962.

CODERRE T.J., WALL P.D. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. **Pain**, 28:379-93, 1987.

PIRCIO A.W., FEDELE C.T., BIERWAGEN M.E. A new method for the evaluation of analgesic activity using adjuvant-induced arthritis in the rat. **Eur J Pharmacol**, 31:207-15, 1975.

VAN ARMAN C.G., CARLSON R.P., RISLEY E.A., THOMAS R.H., NUSS G.W. Inhibitory effects of indomethacin, aspirin and certain other drugs on inflammations induced in rat and dog by carrageenan, sodium urate and ellagic acid. **J Pharmacol Exp Ther**, 175:459-68, 1970.

BRACKERTZ D., MITCHELL G.F., MACKAY I.R. Antigen-induced arthritis in mice: I. Induction of arthritis in various strains of mice. **Arthritis Rheum**, 20:841–50, 1977.

FERNIHOUGH J., GENTRYA C., MALCANGIOA M., FOXA A., REDISKE J., PELLASB T. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. **Pain**, 112:83-93, 2004.

SCHUELERT N., MCDUGALL J.J. Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. **Neurosci Lett**, 465:184-8, 2009.

MARTINS M.A., BASTOS L.C., TONUSSI C.R. Formalin injection into knee joint of rats: Pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. **J Pain**, 7:100-107, 2006.

DUBUISSON D., DENNIS S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, 4:161-4, 1977.

ABBOTT F.V., HONG Y., BLIER P. Activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. **Neuropharmacol**, 35:99-110, 1996.

WHEELER-ACETO H., COWAN A. Neurogenic and tissue-mediated components of formalin-induced edema: evidence for supraspinal regulation. **Agents Act**, 34:264-9, 1991.

TAYLOR E.L., SELLON D.C., WARDROP K.J., HINES M.T., KINGSTON J.K. Effects of intravenous administration of formaldehyde on platelet and coagulation variables in healthy horses. **Am J Vet Res**, 61:1191-6, 2000.

DICKENSON A.H., SULLIVAN A.F. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. **Neurosci Lett**, 83:207-11, 1987.



CODERRE T.J., VACCARINO A.L., MELZACK R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Res**, 535:155-8, 1990.

TJØLSEN A., BERGE O.G., HUNSKAAR S., ROSLAND J.H., HOLE K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51:5-17, 1992.

TAYLOR B.K., PETERSON M.A., BASBAUM A.I. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J Neurosci**, 15:7575-84, 1995.

KANEKO M., HAMMOND D.L. Role of spinal gamma-aminobutyric acidA receptors in formalin-induced nociception in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, 282:928-38, 1997.

CARSTENS E. Responses of rat spinal dorsal horn neurons to intracutaneous microinjection of histamine, capsaicin, and other irritants. **J Neurophysiol**, 77:2499-514, 1997.

PARADA CA, TAMBELI CH, CUNHA FQ, FERREIRA SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neurosci**, 102:937-44, 2001.

SHIBATA M., OHKUBO T., TAKAHASHI H., INOKI R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, 38:347-52, 1989.

HONG Y., ABBOTT F.V. Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. **Eur J Pharmacol**, 277:21-8, 1995.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16:109-110, 1983.

TONUSSI C.R., FERREIRA S.H. Rat knee-joint carrageenan incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, 48:421-427, 1992.

DE OLIVEIRA D.T., SOUZA-SILVA E., TONUSSI C.R. Gingival vein puncture: A new simple technique for drug administration or blood sampling in rats and mice. **Scand J Lab Anim Sci**, 36:109-113, 2009.

STEELE R.H., WILHELM D.L. The inflammatory reaction in chemical injury. Increased vascular permeability and erythema induced by various chemicals. **Br J Exp Pathol**, 47:612-23, 1966.

WESOŁOWSKA A., BORYCZ J., PALUCHOWSKA M.H., CHOJNACKA-WÓJCIK E. Pharmacological analysis of the hypothermic effects of NAN-190 and its analogs, postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists, in mice. **Pol J Pharmacol**, 54:391-9, 2002.

YOUNG R., KHORANA N., BONDAREVA T., GLENNON R.A. Pizotyline effectively attenuates the stimulus effects of N-methyl-3,4-methylenedioxymphetamine (MDMA). **Pharmacol Biochem Behav**, 82:404-10, 2005.

KATAYAMA K., ASANO K., HAGA K., FUKUDA T. High affinity binding of azasetron hydrochloride to 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors in the small intestine of rats. **Jpn J Pharmacol**, 73:357-60, 1997.

PEROUTKA S.J., MCCARTHY B.G. Sumatriptan (GR 43175) interacts selectively with 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> binding sites. **Eur J Pharmacol**, 163:133-6, 1989.

SOUZA-SILVA, E. O papel hiponociceptivo do receptor H<sub>1</sub> articular, 2009. 70f. **Dissertação** (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

BRESSAN E., TONUSSI C.R. Antiinflammatory effects of etoricoxib alone and combined with NSAIDs in LPS-induced reactive arthritis. **Inflamm Res**, 57:586-92, 2008.

TAIWO Y.O., LEVINE J.D. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. **Neurosci**, 48:485–90, 1992.

TAMBELI C.H., OLIVEIRA M.C., CLEMENTE J.T., PELEGRINI-DA-SILVA A., PARADA C.A. A novel mechanism involved in 5-hydroxytryptamine-induced nociception: the indirect activation of primary afferents. **Neurosci**, 141:1517-24, 2006.

HERBERT, M.K., SCHMIDT, R.F. Activation of normal and inflamed fine articular afferent units by serotonin. **Pain**, 50: 79-88, 1992.

ALSTERGREN P., KOPP S. Pain and synovial fluid concentration of serotonin in arthritic temporomandibular joints. **Pain**, 72:137-43, 1997.

KRESS M., REEH P. W., VYKLICKY L. An interaction of inflammatory mediators and protons in small diameter dorsal root ganglion neurons of the rat. **Neurosci Lett**, 224, 37–40, 1997.

LINDER A.E., NI W., DIAZ J.L., SZASZ T., BURNETT R., WATTS S.W. Serotonin (5-HT) in veins: not all in vain. **J Pharmacol Exp Ther**, 323:415–421, 2007.

FINK K.B., GÖTHERT M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. **Pharmacol Rev**, 59:360-417, 2007.

CODERRE T.J., BASBAUM A.I., LEVINE J.D. Neural control of vascular permeability: interactions between primary afferents, mast cells, and sympathetic efferents. **J Neurophysiol**, 62:48-58, 1989.

KAYSER V., ELFASSI I.E., AUBEL B., MELFORT M., JULIUS D., GINGRICH J.A., HAMON M., BOURGOIN S. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-

HT1A<sup>-/-</sup>, 5-HT1B<sup>-/-</sup>, 5-HT2A<sup>-/-</sup>, 5-HT3A<sup>-/-</sup> and 5-HTT<sup>-/-</sup> knock-out male mice. **Pain**, 130:235-48, 2007.

OKAMOTO K., IMBE H., TASHIRO A., KIMURA A., DONISHI T., TAMAI Y., SENBA E. The role of peripheral 5HT2A and 5HT1A receptors on the orofacial formalin test in rats with persistent temporomandibular joint inflammation. **Neurosci**, 130:465-74, 2005.

WOTHERSPOON G., PRIESTLEY J.V. Expression of the 5-HT1B receptor by subtypes of rat trigeminal ganglion cells. **Neurosci**, 95:465-71, 2000.

POTREBIC S., AHN A.H., SKINNER K., FIELDS H.L., BASBAUM A.I. Peptidergic nociceptors of both trigeminal and dorsal root ganglia express serotonin 1D receptors: implications for the selective antimigraine action of triptans. **J Neurosci**, 23:10988-97, 2003.

RUEFF A., DRAY A. 5-Hydroxytryptamine-induced sensitization and activation of peripheral fibres in the neonatal rat are mediated via different 5-hydroxytryptamine-receptors. **Neurosci**, 50:899-905, 1992.

TOKUNAGA A., SAIKA M., SENBA E. 5-HT2A receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. **Pain**, 76:349-55, 1998.

OKAMOTO K., IMBE H., MORIKAWA Y., ITOH M., SEKIMOTO M., NEMOTO K., SENBA E. 5-HT2A receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats. **Pain**. 2002 Sep;99(1-2):133-43.

GIORDANO J., ROGERS L.V. Peripherally administered serotonin 5-HT3 receptor antagonists reduce inflammatory pain in rats. **Eur J Pharmacol**, 170:83-6, 1989.

OKAMOTO K., IMBE H., TASHIRO A., KUMABE S., SENBA E. Blockade of peripheral 5HT3 receptor attenuates the formalin-

induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. **Neurosci Lett**, 367:259-63, 2004.

COLPAERT F.C. 5-HT(1A) receptor activation: new molecular and neuroadaptive mechanisms of pain relief. **Curr Opin Investig Drugs**, 7:40-7, 2006.

PAVLAKOVIĆ G., TIGGES J., CROZIER T.A. Effect of buspirone on thermal sensory and pain thresholds in human volunteers. **BMC Clin Pharmacol**, 29:9-12, 2009.

DESEURE K., BRÉAND S., COLPAERT F.C. Curative-like analgesia in a neuropathic pain model: parametric analysis of the dose and the duration of treatment with a high-efficacy 5-HT(1A) receptor agonist. **Eur J Pharmacol**, 568:134-41, 2007.

WEI H., CHEN Y., HONG Y. The contribution of peripheral 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor to carrageenan-evoked hyperalgesia, inflammation and spinal C-fos protein expression in the rat. **Neurosci**, 132:1073–82, 2005.

SASAKI M., OBATA H., KAWAKARA K., SAITO S., GOTO F. Peripheral 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats. **Pain**, 122:130–6, 2006.

KLING A., RANTAPÄÄ-DAHLQVIST S., STENLUND H., MJÖRNDAL T. Decreased density of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, 65:816-9, 2006.

XIE H., DONG Z.Q., MA F., BAUER W.R., WANG X., WU G.C. Involvement of serotonin 2A receptors in the analgesic effect of tramadol in mono-arthritic rats. **Brain Res**, 1210:76-83, 2008.

HONG Y., JI H., WEI H. Topical ketanserin attenuates hyperalgesia and inflammation in arthritis in rats. **Pain**, 124:27-33, 2006.

PEISER C., TREVISANI M., GRONEBERG D.A., DINH Q.T., LENCER D., AMADESI S., MAGGIORE B., HARRISON S., GEPPETTI P., FISCHER A. Dopamine type 2 receptor expression and function in rodent sensory neurons projecting to the airways. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 289:153-8, 2005.

PELISSIER T., LAURIDO C., HERNANDEZ A., CONSTANDIL L., ESCHALIER A. Biphasic effect of apomorphine on rat nociception and effect of dopamine D2 receptor antagonists. **Eur J Pharmacol**, 546:40-7, 2006.

MARICQ A.V., PETERSON A.S., BRAKE A.J., MYERS R.M., JULIUS D. Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin gated ion channel. **Science**, 254:432-437, 1991.

MILLAN M.J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, 66:355-474, 2002.

NAKAJIMA K., OBATA H., ITO N., GOTO F., SAITO S. The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. **Eur J Pain**, 13:441-7, 2009.

HONG Y., ABBOTT F.V. Contribution of peripheral alpha 1A-adrenoceptors to pain induced by formalin or by alpha-methyl-5-hydroxytryptamine plus noradrenaline. **Eur J Pharmacol**, 301:41-8, 1996.

LINDE M., MELLBERG A., DAHLÖF C. Subcutaneous sumatriptan provides symptomatic relief at any pain intensity or time during the migraine attack. **Cephal**, 26:113-21, 2006.

LIMMROTH V., MAY A., AUERBACK P., WOSNITZA G., EPPE T., DIENER H.C. Changes in cerebral blood flow velocity after treatment with sumatriptan or placebo and implications for the pathophysiology of migraine. **J Neurol Sci**, 138:60-5, 1996.

NIKAI T., BASBAUM A.I., AHN A.H. Profound reduction of somatic and visceral pain in mice by intrathecal administration of the anti-migraine drug, sumatriptan. **Pain**, 139:533-40, 2008.

DURHAM P.L., RUSSO A.F. Stimulation of the calcitonin gene-related peptide enhancer by mitogen-activated protein kinases and repression by an antimigraine drug in trigeminal ganglia neurons. **J Neurosci**, 23:807-15, 2003.

NICHOLSON R., SMALL J., DIXON A.K., SPANSWICK D., LEE K. Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. **Neurosci Lett**, 3:119-22, 2003.

GOADSBY P., LIPTON R., FERRARI M.D. Migraine - current understanding and treatments. **N Engl J Med**, 346:257-70, 2002.

HILL S.J., GANELLIN C.R., YOUNG J.M., SCHUNACK W., LEVI R., HASS H.L. Classification of histamine receptors. **Pharmacol Review**, 49:253-270, 1997.

SCHAIBLE H.G., SCHMIDT R.F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E<sub>2</sub>. **J Physiol**, 403:91-104, 1988.

WILLIS W.D. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edge sword. **Exp Brain Res**, 124:395-421, 1999.

SUEDEKUM E.W.M. Estudo da manipulação tubular renal de sódio e da pressão arterial em ratos após o tratamento com furosemda: envolvimento de receptores AT<sub>1</sub> da angiotensina e da inervação renal, 2002. 158f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual e Campinas, Campinas, 2002.

## ANEXO – DESCRIÇÃO RESUMIDA DA PUNÇÃO GENGIVAL



Com o animal sob leve anestesia abaixar o lábio inferior e inserir somente 2 mm da agulha (28-30 G) na gengiva. O ponto exato fica localizado entre os incisivos inferiores conforme demonstrado.



O procedimento deve ser realizado em um ângulo de 20 a 25° com a linha dos incisivos.